



**Maria Angélica
Martins Rocha**

**Isolamento e caracterização estrutural das
arabinoxilanas da dreche cervejeira**



**Maria Angélica
Martins Rocha**

Isolamento e caracterização estrutural das arabinoxilanas da dreche cervejeira

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica – Especialidade Bioquímica Alimentar (2º Ciclo) realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro do POCTI no âmbito
do III Quadro Comunitário de Apoio.

Trabalho enquadrado no projecto
QREN - Valorização da Dreche da
Cerveja (Dreche Valor) (Referência
BIIC/UI51/4096/2009)

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmã e ao Mário (futuro marido) pelo
incansável apoio.

“Sofremos demasiado pelo pouco que nos falta e alegremo-nos pouco pelo
muito que temos”

(William Shakespeare)

O júri

Presidente

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
Professor associado da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor associado com agregação da Universidade de Aveiro

Co-orientador

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador auxiliar da Universidade de Aveiro

Arguente

Prof. Doutora Isabel Maria Pinto Leite Viegas Oliveira Ferreira
Investigador auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

agradecimentos

Para o desenvolvimento e concretização deste trabalho contribuíram várias pessoas a quem quero expressar o meu sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores ao Prof. Doutor Manuel António Coimbra e ao Prof. Doutor Jorge Saraiva, pela oportunidade para a realização desta dissertação. E, pelo seu esforço e dedicação na orientação deste tema, estando sempre disponível para me ajudar e o mais importante de tudo os ensinamentos transmitidos ao longo da realização desta dissertação.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório que me ajudaram de maneiras diferentes e pelas pausas do café, à Elisabete, à Élia, à Isabel, à Cláudia Nunes, à Cláudia Passos, à Lisete, à Juliana, à Rosa, à Vera, à Joana, à Susana, à Angela, à Regina, à Beatriz, ao Pedro, ao Mickael, ao Michael, ao Ângelo, ao Victor e ao Fernando.

Gostaria de agradecer, à Unicer – Bebidas de Portugal, S.A. pelo fornecimento dos lotes de dreche cervejeira.

Gostaria de agradecer, à Unicer – Bebidas de Portugal, S.A , CIENCINVEST eo QREN pelo ao financiamento do projecto, designado por Valorização da Dreche da Cerveja (DrecheValor).

À Doutora Diana Pinto pela amabilidade de ter cedido a utilização do micro-ondas do grupo da Química orgânica da unidade do QOPNA.

Por fim, aos meus pais, a minha irmã e ao Mário (futuro marido), gostaria de agradecer pelo apoio que sempre me deram, pelo incentivo, pela ajuda, pelos conselhos, pelos meios que proporcionaram, pelo carinho e inesgotável paciência nos meus momentos mais difíceis deste longo percurso que chega ao fim. E é a eles que dedico esta dissertação.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste difícil percurso e que não enunciei, deixo os mais sinceros votos de agradecimento e amizade.

Palavras-chave

Dreche cervejeira, polissacarídeos, arabinoxilanas, extracção alcalina, irradiação por micro-ondas

Resumo

A dreche cervejeira é um subproduto resultante da filtração do mosto (líquido extraído) do processo de maceração durante o fabrico da cerveja. A dreche é composta maioritariamente de material de casca de cevada, tem 76,4 a 72,6 % de água e os restantes 23,4 a 27,4 correspondem à quantidade de matéria orgânica. A composição química da dreche seca consiste principalmente de polissacarídeos e proteínas. A maioria é polissacarídeos são arabinoxilanas (AX, 26,9 a 20,7%), celulose (8,9 a 17,8%) e β -glucanas (4,7 a 13,4%).

As AX da dreche são compostas por uma cadeia linear de resíduos de xilose em ligação $\beta(1\rightarrow4)$, contendo resíduos de arabinose como cadeias laterais. Estes polímeros têm sido descritos como polissacarídeos com actividade prebiótica.

Para considerar a dreche uma fonte de AX economicamente viável, a extracção desses polissacarídeos precisa de ser melhorada e diversificada. Isto é possível através da combinação de metodologias de extracção convencionais e novas tecnologias.

Neste trabalho, a metodologia de extracção com reagentes alcalinos (KOH 0,1 M, 0,5 M, 1 M e 4 M) foi optimizada e adaptada ao processo industrial, tendo-se concluído que o processo mais eficiente envolve extracções mais prolongadas (24 h). A extracção das AX da dreche foi também realizada com irradiação de microondas de suspensões aquosas a diferentes temperaturas. A quantidade de AX isoladas pela extracção alcalina totalizaram 73% do total das AX da dreche e as AX extraídas por microondas representaram 43%. As AX extraídas com KOH são mais longas e a proporção de arabinose/xilose é menor do que as extraídas por micro-ondas. Estas duas tecnologias proporcionam uma grande variedade de AX e oligossacarídeos que estão disponíveis como ingredientes alimentares com possível actividade prebiótica.

Keywords

Brewers' spent grain, polysaccharides, arabinoxylans, alkaline extraction, microwave irradiation

Abstract

The brewers' spent grain (BSG) is a by-product resultant of the filtration of the liquid extracted from the mashing process during the brewing of beer. The BSG is composed majority of material from barley husks. The BSG has 76.4-72.6% of moisture content and 23.6-27.4% of organic material. The chemical composition of dry BSG consists mainly of polysaccharides and protein. The major polysaccharides are arabinoxylans (AX, 29,6-23,3%), cellulose (17%), and β -glucans.

BSG arabinoxylans are composed by a backbone of β -(1 \rightarrow 4)-linked xylose residues containing single arabinose units as side chains. These polymers have been shown to be a source of polysaccharides with prebiotic activity.

To consider the BSG a source of AX economically feasible, the extraction of these polysaccharides need to be improved and diversified. This is possible by combining conventional and newer technologies.

In this work, the methodology of extraction with alkali reagents (KOH 0.1 M, 0.5 M, 1 M, and 4 M) was optimized and adapted to the industrial process, allowing to conclude that the more efficient procedure need to used longer alkali extractions of 24 h.

As microwave extraction has been recently proposed for extraction of AX from the flour industry barley residue, in this study, the extraction of BSG AX was also performed with microwave irradiation of aqueous suspensions at different temperatures. The amount of AX isolated by alkali extraction totalized 73% of the total in BSG and those extracted by microwave accounted for 43%. The AX extracted with KOH are longer are the ratio of arabinose/xylose is lower than those extracted by microwaves. These two technologies proved to be relevant for the extraction of a large range of AX and AX oligosaccharides that are available as food ingredients with possible prebiotic activity.



Índice Geral

Júri

Resumo

Abstract

Índice de geral i-iii

Nomenclatura das fracções..... iv-v

Índice de tabelas vi

Índice de figuras vii-viii

Capítulo I- Revisão Bibliográfica

1.1. As arabinoxilanas dos cereais.....	2-6
1.2. Potenciais aplicações das arabinoxilanas.....	7-9
1.3. Dreche cervejeira	9-14
1.4. Métodos de extracção das arabinoxilanas.....	14-16
5. Relevância e objectivos do trabalho.....	16-17

Capítulo II- Material & Métodos

2.1. Amostragem e identificação dos cinco lotes de dreche	19
2.2. Acondicionamento dos cinco lotes de dreche.....	19



2.3. Extracção de AX da dreche.....	20-25
2.3.1. Extracção sequencial das AX da dreche com solventes aquosos	20-23
2.3.2. Extracção de AX da dreche por tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas	23-25
2.4. Análises químicas	25-34
2.4.1. Determinação da quantidade de água pelo método da secagem em estufa.....	25-26
2.4.2. Determinação da quantidade de cinzas pelo método da mufla	26
2.4.3. Determinação da quantidade de lípidos por extracção directa em soxhlet... 26	
2.4.4. Determinação da quantidade de proteínas por análise elementar	26
2.4.5. Determinação da composição de açúcares neutros e de ácidos urónicos.....	27-30
2.4.5.1. Análise dos açúcares neutros como acetatos de alditol por GC-FID.....	27-29
2.4.5.2. Análise dos ácidos urónicos pelo método colorimétrico.....	29-30
2.5. Caracterização estrutural das AX por metilação.....	30-32
2.5.1. Análise de metilação	30
2.5.2. Reacção de metilação.....	30-31
2.5.3. Hidrólise, redução e acetilação das fracções metiladas... ..	31-32
2.6. Quantificação do material proteico	32
2.6.1. Análise de aminoácidos	32-34
2.7. Análise Estatística.....	34

Capítulo III- Resultados & Discussão

3.1. Análises químicas efectuadas aos cinco lotes de dreche	36-39
---	-------



3.2. Extracção de AX da dreche com solventes aquosos.....	39-48
3.3. Análise do material proteico	49
3.3.1. Análise de aminoácidos	49-50
3.4. Optimização da extracção sequencial das AX tendo em vista a sua aplicação industrial	51-62
3.4.1. Extracção Sequencial B	51-53
3.4.2. Extracção Sequencial C	53-55
3.4.3. Extracção Sequencial D	55-57
3.4.4. Efeito do aumento do tempo de extracção na quantidade de Ax extraídas... ..	57-58
3.4.5. Efeito da diminuição de reagente alcalino na quantidade de AX extraídas	59-62
3.5. Extracção das AX por tratamento hidrotérmico assistidos por micro-ondas...	62-69
3.5.1. Medição do pH antes e depois das experiências do micro-ondas	62-64
3.5.2. Análise de açúcares neutros e análise de metilação das fracções obtidas por micro-ondas	64-69

Capítulo IV- Conclusão

4. Conclusão.....	71
-------------------	----

Capítulo V- Perspectivas de Estudos Futuros

5. Perspectivas de Estudos Futuros	73
--	----

Capítulo VI- Referências Bibliográficas

6.Referências Bibliográficas	75-89
------------------------------------	-------



Nomenclatura das Fracções

AIR- Resíduo insolúvel em etanol

CR (Residue Cellulosic) – Resíduo celulósico obtido após a extracção das AX

ET70 – Fracção que precipita após a adição de etanol até 70 % (v/v) de etanol.

ETSN– Fracção solúvel em etanol após a adição de etanol

Material de Alto Peso Molecular ou HMWM- Material recuperado após a diálise (12-14 kDa) dos extractos obtidos da extracção sequencial a partir da drecche cervejeira.

Pp H₂O-1 – Fracção insolúvel do extracto obtido com água à temperatura ambiente, formado após a diálise, congelada e liofilizada.

Pp H₂O-2 – Fracção insolúvel do extracto obtido com água à 80 °C, formado após a diálise, congelada e liofilizada.

Pp KOH 0,1M – Fracção insolúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 0,1M, após a diálise, congelada e liofilizada

Pp KOH 0,5M – Fracção insolúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 0,5M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Pp KOH 1M – Fracção insolúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 1M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Pp KOH 4M – Fracção insolúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 1M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Pp NaClOH – Fracção insolúvel do extracto obtido com tratamento de deslenhificação, formado após a diálise, congelada e liofilizada



Sn H₂O-1 – Fracção solúvel do extracto obtido com água à temperatura ambiente, após a diálise, congelada e liofilizada.

Sn H₂O-2 – Fracção solúvel do extracto obtido com água à 80 °C, após a diálise, congelada e liofilizada.

Sn KOH 0,1M – Fracção solúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 0,1M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Sn KOH 0,5M – Fracção solúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 0,5M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Sn KOH 1M – Fracção solúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 1M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Sn KOH 4M – Fracção solúvel após a acidificação do extracto obtido com KOH 4M, após a diálise, congelada e liofilizada.

Sn NaClOH – Fracção insolúvel do extracto obtido com tratamento de deslenhificação, formado após a diálise, congelada e liofilizada

SnCR – Fracção solúvel após a acidificação do resíduo, após a diálise, congelada e liofilizada.

**Índice de tabelas**

Tabela 1:	Características glicosídicas das AX dos componentes dos cereais como o trigo, a cevada, o arroz, o milho e o centeio.....	5-6
Tabela 2:	Composição química do grão de cevada (MacGregor, 1993).....	10
Tabela 3:	Composição do material polissacarídico das diferentes paredes celulares dos tecidos que compõem o grão de cevada.....	11
Tabela 4:	Composição química da dreche e a variabilidade entre estudos.....	14
Tabela 5:	Identificação dos lotes de BSG, datas de recolha e de recepção.....	19
Tabela 6:	Composição química resumida dos diferentes lotes de dreche analisados.	37
Tabela 7:	Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares ^a do material polimérico da dreche das fracções obtidas pela extracção sequencial com solventes aquosos (água, água a 80 °C e soluções de KOH de concentração crescente 0,1, 0,5, 1 e 4M, designada por extracção sequencial A.....	41
Tabela 8:	Análise de metilação (percentagem molar) das fracções de sobrenadantes obtidas durante a extracção sequencial A. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada fracção.....	45
Tabela 9:	Análise de metilação (percentagem molar) das fracções de precipitados obtidos durante a extracção sequencial A. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada fracção	46
Tabela 10:	Composição em aminoácidos (g de material / 100 g de fracção) das fracções extraídas com soluções de KOH e com o teor de açúcares não superior a 41,6% (g / 100g).....	50
Tabela 11:	Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares ^a do material polimérico da dreche das fracções obtidas pela extracção sequencial com soluções de KOH de concentração crescente, 0,5e 4 M, designado por extracção sequencial B.....	52
Tabela 12:	Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares ^a do material polimérico do AIR da dreche e das fracções obtidas pela extracção sequencial C.....	55
Tabela 13:	Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares ^a do material polimérico do AIR da dreche e das fracções obtidas pela extracção sequencial D.....	57
Tabela 14:	Rendimento e composição em açúcares das fracções obtidas nas diferentes experiências utilizando a irradiação d o MW. Os valores apresentados são médias de quadruplicados para cada ensaio de temperatura.....	65



Índice de figuras

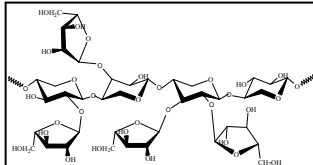
Figura 1:	Secção longitudinal do grão da cevada (Eliasson, 2006).....	2
Figura 2:	Representação da estrutura da AX na conformação em cadeira dos resíduos de D-Xylp em ligação β -(1 \rightarrow 4).....	3
Figura 3:	Anatomia do grão de cevada (Kent, 1983; Jadhav et al., 1998).....	10
Figura 4:	Estrutura de uma arabinoxilana nativa da casca da cevada segundo Høije et al. (2006).....	11
Figura 5:	Representação esquemática do processo que permite obter a dreche cervejeira a partir dos grãos de cevada natural (Mussatto et al., 2006).....	12
Figura 6:	Fluxograma da extracção sequencial A das AX da dreche com água, água quente e soluções alcalinas (KOH) de concentração crescente.....	23
Figura 7:	Esquema experimental do processo de extracção de AX da dreche por tratamento hidrotérmico utilizando a irradiação por microondas. Para cada experiência foram obtidas 3 fracções: “ET70”, “ETSn”, “CR.”.....	24
Figura 8:	Massa das fracções obtidas de dreche após a extracção sequencial A obtida pela Universidade de Aveiro (UA) e comparação com os resultados da literatura (Institute of Food Research - IFR) (Mandalari et al., 2005).....	40
Figura 9:	Comparação da extracção sequencial obtida pela UA e com a publicada pelo IFR na extractabilidade das AX.....	48
Figura 10:	Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extracção e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção. Comparação entre os resultados da UA e os publicados pelo IFR.....	48
Figura 11:	Composição molar em aminoácidos das fracções precipitadas após neutralização dos extractos alcalinos.....	50
Figura 12:	Fluxograma da extracção sequencial das AX da dreche (BSG) somente com soluções crescentes 0,5 e 4 M (extracção sequencial B).....	51
Figura 13:	Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extracção e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção, para as extracções sequenciais A, B, C e D.....	53
Figura 14:	Fluxograma da extracção sequencial das AX a partir do AIR dreche (BSG) somente com soluções crescentes 0,5 e 4 M (extracção sequencial C).....	54
Figura 15:	Fluxograma da extracção sequencial das AX a partir do AIR deslenhificado da dreche (BSG) somente com soluções crescentes 0,5 e 4 M (extracção sequencial D).....	56
Figura 16:	Quantidade de AX extraídas nos diferentes soluções de KOH, do SnCR e as AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção, nas diferentes condições de temperatura e do tempo extracção.....	58
Figura 17:	Extracção sequencial das AX da dreche com soluções de KOH com concentrações crescentes para o rácio de dreche /KOH 1:5.....	60
Figura 18:	Extracção sequencial das AX da dreche com soluções de KOH com concentrações crescentes para o rácio de dreche /KOH 1:2.....	61
Figura 19:	Comparação da extracção sequencial com soluções crescentes de KOH obtida pela extractabilidade das AX para os rácios de dreche /KOH 1:5 e 1:2. Os valores apresentados nas barras correspondem à massa de AX extraída por tonelada de dreche.....	62
Figura 20:	Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extracção e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção. Os valores apresentados nas barras correspondem à massa de AX extraída por tonelada de dreche.....	62
Figura 21:	Representação gráfica da medição de pH nas diferentes experiências de temperaturas (140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C) utilizadas no tratamento com MW. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada ensaio de temperatura.....	64



Índice de figuras

Figura 22:	Representação gráfica da quantidade de AX extraída nos diferentes ensaios de temperaturas (140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C) utilizadas no tratamento hidrotérmico da BSG, utilizando a irradiação do MW. Os valores apresentados são médias de quadruplicados para cada ensaio de temperatura.....	67
-------------------	---	----

Capítulo I



Revisão Bibliográfica





Capítulo I – Revisão Bibliográfica

1.1. As arabinoxilanas dos cereais

As arabinoxilanas (AX) são componentes estruturais das paredes celulares dos cereais. Estas têm sido identificadas e estudadas numa variedade de tecidos dos principais cereais comercializados, nomeadamente o trigo, o centeio, a aveia, o arroz, o sorgo e a cevada.

Estruturalmente, os grãos dos cereais são organizados em três componentes principais: a casca, o endosperma e o embrião (Evers *et al.*, 2002). A **Figura 1** pretende ilustrar o corte longitudinal do grão de cevada com a respectiva identificação dos componentes principais, nomeadamente, a casca (**A**), o endosperma (**B**) e o embrião (**C**).

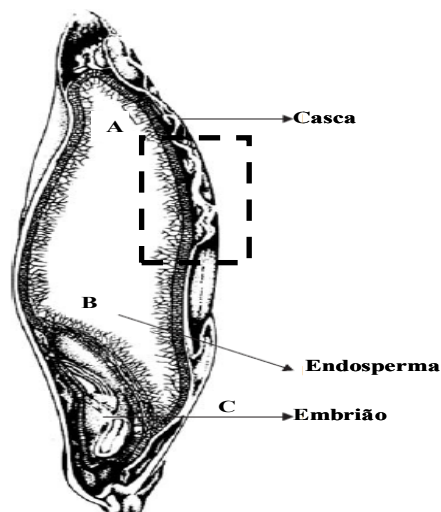


Figura 1: Secção longitudinal do grão da cevada (Eliasson, 2006).

A casca do grão de cereais é constituída por várias camadas de um tecido morto, e tem como função proteger do ataque de microorganismos, bem como as partes internas do grão a choques e a abrasões. Regula ainda as trocas gasosas com o exterior e a velocidade de re-hidratação. Para além disso, ainda delimita a parte interna do grão que é organizada em dois componentes distintos: o embrião e o endosperma amiláceo (Evers *et al.*, 2002). As cascas dos cereais são essencialmente constituídas por polissacarídeos, nomeadamente as AX, a celulose e as β -glucanas de ligação mista.

O endosperma amiláceo e o aleurona são dois tecidos totalmente distintos que fazem parte da constituição do endosperma (Evers *et al.*, 2002).



O endosperma amiláceo dos cereais, constituído essencialmente por amido, é um tecido de reserva do grão e tem como função nutrir o embrião, aquando da germinação. As paredes celulares do endosperma amiláceo são maioritariamente constituídas por β -glucanas de ligação mista e AX (Izidorczyk *et al.*, 1995).

O tecido de aleurona é uma importante fonte de enzimas hidrolíticas, como por exemplo a α -amilase (Lewis & Young, 1995; Evers *et al.*, 2002), que permite degradar o amido do endosperma amiláceo em glucose que é metabolizada pelo embrião durante o processo de germinação. As paredes celulares das células do tecido de aleurona dos grãos de cereais são maioritariamente constituídas por AX e β -glucanas de ligação mista (Izidorczyk *et al.*, 1995).

O embrião do grão dos cereais contém vitaminas do complexo B, algumas proteínas, minerais e lípidos (Izidorczyk *et al.*, 1995). É o órgão de onde se desenvolverá a nova descendência de plantas.

As AX dos cereais encontram-se maioritariamente nas paredes celulares das células do tecido de aleurona e nas das cascas dos cereais. No entanto, podem ainda estar presentes nas paredes celulares do endosperma amiláceo.

Estruturalmente, as AX dos cereais são heteropolissacarídeos compostos unicamente por resíduos de xilose (Xyl) e arabinose (Ara). A sua cadeia principal é constituída por resíduos de D-Xylp em ligações β -(1 \rightarrow 4), com ramificações laterais de L-Araf em ligações α -(1 \rightarrow 2) e/ou α -(1 \rightarrow 3) (**Figura 2**) (Izidorczyk *et al.*, 1995; Dervilly *et al.*, 2002).

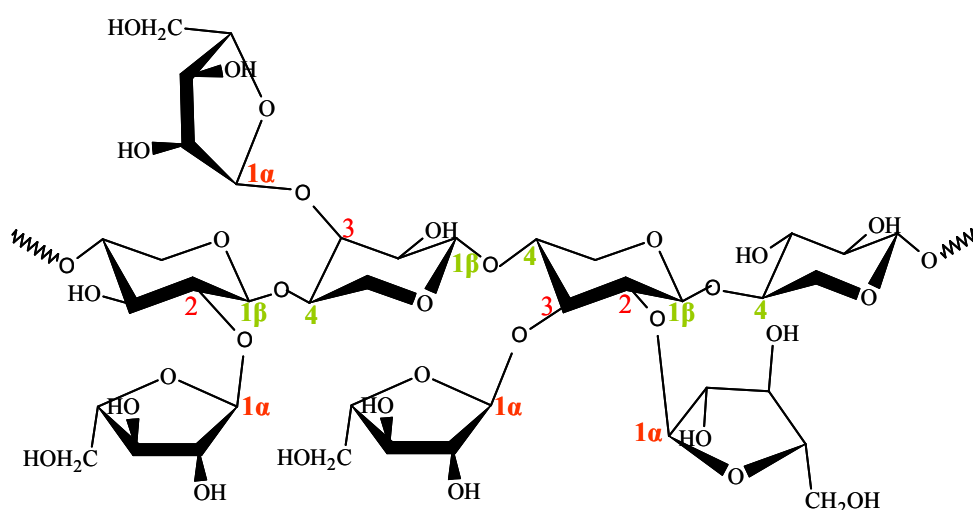


Figura 2: Representação da estrutura da AX na conformação em cadeira dos resíduos de D-Xylp em ligação β -(1 \rightarrow 4).



Para além dos resíduos de L-arabinose, as AX dos cereais podem conter nas suas cadeias laterais resíduos de ácido α -D-glucurónico e de ácido 4-O-metil-glucurónico como constituintes menos frequentes. No entanto, poderão ainda existir di- e trissacarídeos constituídos por resíduos de xilose e de galactose unidos por ligações glicosídicas ao resíduo arabinose que se encontra ligado directamente à xilana (Saulnier *et al.*, 2007). As AX podem ainda estar esterificadas com ácido acético e/ou ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente, o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico. A ligação de esterificação dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico ocorre no grupo hidroxilo na posição 5 do resíduo de arabinose ligado directamente ao resíduo xilose da cadeia da xilana (Antoine *et al.*, 2005; Rhoads *et al.*, 2002).

Estes ácidos hidroxicinâmicos são agentes de ligações cruzadas (cross-linking) entre as AX e outros polissacarídeos e lenhina, promovendo a coesão dos tecidos e a restrição da expansão celular e controlando também as propriedades mecânicas dos tecidos (Bunzel *et al.*, 2008; Grabber *et al.*, 2000). O ácido ferúlico está ligado à lenhina por uma ligação éter (Adams *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2005).

As AX dos cereais apresentam heterogeneidade estrutural devido à presença de padrões de substituição e de polimerização distintos (Vinkx & Delcour, 1996). Tal heterogeneidade está dependente da variabilidade genética entre as espécies e dos factores ambientais (Saulnier *et al.*, 2007).

As AX do tecido do endosperma amiláceo são mais ramificadas e apresentam um menor grau de esterificação do que as AX do tecido de aleurona (Antoine *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 2005), pelo que, mesmo dentro do grão, as AX apresentam variabilidade estrutural.

A **Tabela 1** resume as características estruturais das AX dos diferentes tecidos de alguns cereais como o trigo, a cevada, o arroz, o milho e o centeio.

**Tabela 1:** Características glicosídicas das AX dos componentes dos cereais como o trigo, a cevada, o arroz, o milho e o centeio

Cereal	Tecido	Monossacarídeos		Ara/Xyl	Referências
		Cadeia Principal	Cadeia laterais		
Trigo	Endosperma	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a] 2-O- β -D-Xlyp- α -Araf ^[b] 4-O-Me- α -D-GlcpA ^[c] α -D-GlcpA ^[c]	0,50 ^[d]	^[a] Hollmann & Lindhauer, 2005 ^[b] Pastell <i>et al.</i> , 2009a ^[d] Saulnier <i>et al.</i> , 2007
	Farelo	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a] α -D-GlcpA ^[b]	0,40-0,63 ^[c]	^[a] Izdorezyk <i>et al.</i> , 1995 ^[b] Schooneveld-Bergmans <i>et al.</i> , 1999 ^[c] Kabel <i>et al.</i> , 2002
	Endosperma	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a]	0,73 ^[b]	^[a] Izdorezyk <i>et al.</i> , 1995 ^[b] Pitkänen <i>et al.</i> , 2008
Cevada	Casca	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a] 2-O- β -D-Xlyp- α -Araf ^[a] 4-O-Me- α -D-GlcpA ^[a]	0,20 ^[a]	^[a] Hoije <i>et al.</i> , 2006
	Endosperma	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a]	0,80 ^[a]	^[a] Muralikrishna <i>et al.</i> , 2007
Arroz	Casca	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a] 2-O- β -D-Xlyp- α -Araf ^[a] 4-O-Me- α -D-GlcpA ^[a]	—	^[a] Pastell <i>et al.</i> , 2009a
	Endosperma	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a]	—	^[a] Izdorezyk <i>et al.</i> , 1995
Milho	Casca	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a] 4-O-Me- α -D-GlcpA ^[a]	—	^[a] Pastell <i>et al.</i> , 2009a
	Endosperma	β -(1 \rightarrow 4)-D-Xylp	α -(1 \rightarrow 2)-L-Araf ^[a] α -(1 \rightarrow 3)-L-Araf ^[a]	—	^[a] Pastell <i>et al.</i> , 2009a



Centeio	Endosperma	β -(1→4)-D-Xylp	α -(1→2)-L-Araf ^[a] α -(1→3)-L-Araf ^[a]	_____	^[a] Izdoreczyk <i>et al.</i> , 1995
	Casca	β -(1→4)-D-Xylp	α -(1→2)-L-Araf ^[a] α -(1→3)-L-Araf ^[a]		^[a] Izdoreczyk <i>et al.</i> , 1995



1.2. Potenciais aplicações das arabinoxilanas

As AX, os arabinoxilo-oligossacarídeos (AXOS) e os xilo-oligossacarídeos (XOS) têm potenciais aplicações tecnológicas quer na área alimentar quer na área da saúde.

Na área alimentar, as características estruturais das AX do farelo de trigo, designadas por glucuronoxilanas (GAX), permitem potenciais aplicações como aditivos alimentares, tais como o melhoramento da viscosidade de produtos alimentares (Izydorczyk *et al.*, 1995; Storsley *et al.*, 2003), por exemplo, em compotas, emulsificantes, aplicações em sobremesas e gelados e substitutos de gordura (Hollmann & Lindhauer, 2005). Podem ter ainda aplicações como hidrogéis (Söderderqvist Lindbald *et al.*, 2001; Carvajal-Millan *et al.*, 2005) ou como película biodegradável de revestimento de produtos alimentares (Gröndahl *et al.*, 2004; Höije *et al.*, 2008).

As AX são uma fonte de matéria-prima de xilose para a produção de xilitol (Saha, 2003; Mussato *et al.*, 2005). Para isso, é necessário degradar as AX quer a nível químico, por hidrólise ácida em condições suaves (Carvalho *et al.*, 2004; Mussatto *et al.*, 2005) quer a nível enzimático, utilizando uma combinação de enzimas, como as arabinofurano-hidrolases (Lee, *et al.*, 2001), endo-xilanases e β -xilosidases (Jiang *et al.*, 2004), até a obtenção da xilose. A xilose é transformada em xilitol por um processo de hidrogenação catalítica. O xilitol é utilizado como aditivo alimentar na substituição do açúcar, podendo ser consumido por pessoas diabéticas, dado que o seu metabolismo é independente do da insulina. Para além disso, o xilitol pode ser usado como adoçante em guloseimas para crianças de modo a prevenir as cáries dentárias (Havernaar, 1984; Pepper and Olinger, 1988; Saha & Bosthast, 1997; Bae *et al.*, 2004). Deve-se ao facto de não ser metabolizado pelas bactérias da biota bucal, principalmente *Streptococcus mutans*, e que impede a proliferação destes microorganismos e, em consequência impossibilita a produção de ácidos que atacam o esmalte dos dentes.

As AX dos cereais podem apresentar propriedades antioxidantes e antimutagénicas devido à presença do ácido ferúlico (ácido fenólico) ligado aos resíduos de α -L-arabinose substituinte da cadeia de xilana (Yeh & Yen, 2003).

As AX e os oligossacarídeos derivados (AXOS e XOS) podem ser utilizados como ingredientes alimentares com aplicações nutracêuticas. As AX, AXOS e XOS são consideradas fibra dietética (Hughes *et al.*, 2007; Courtin *et al.*, 2008; Pastell *et al.*, 2009b;



Gullón *et al.*, 2010; Madhukumar *et al.*, 2010). A fibra dietética foi definida pela American Association of Cereal Chemists como “a parte comestível de plantas, hidratos de carbono ou análogos, que são resistentes à digestão e à absorção no intestino delgado humano com completa ou parcial fermentação no intestino grosso.” Estas fibras não são degradadas nem absorvidas no intestino delgado, chegando até ao intestino grosso (Marcfarlane *et al.*, 2006). É no intestino grosso que as fibras dietéticas solúveis são fermentadas pelos microbiota do intestino com a produção de gases como o hidrogénio, dióxido de carbono e ácidos gordos de cadeias curtas e ácido láctico (Saulnier *et al.*, 2009). Os ácidos gordos de cadeia curta como o ácido acético e o ácido propanóico ajudam a reduzir o teor de colesterol plasmático e o ácido butírico está envolvido na redução dos riscos de cancro de cólon por regular a expressão de vários oncogénos e a indução da apoptose de colonócitos transformados (Scheppach *et al.*, 1995; Wollowski *et al.*, 2001; Marcfarlane *et al.*, 2006; Saulnier *et al.*, 2009; Gullón *et al.*, 2010). A produção destes ácidos de cadeia curta por parte da microflora intestinal permite a diminuição do pH intestinal, o que cria um meio desfavorável a microrganismos patogénicos e inibe a conversão bacteriana dos ácidos biliares em compostos secundários com actividade carcinogénica (Saulnier *et al.*, 2009).

Para além disso, as fibras solúveis têm a capacidade de formar soluções viscosas ou géis no intestino delgado, impedindo parcialmente a absorção de alguns compostos como a glucose. Consequentemente, a taxa de absorção é reduzida e desta forma o fluxo de energia fornecido é gradual, mantendo a glicemia em níveis constantes que se traduzem num menor esforço por parte do mecanismo da insulina (Saulnier *et al.*, 2009).

Existem fibras dietéticas insolúveis que não são fermentadas pela microflora intestinal, pelo que são eliminadas pelas fezes. Estas fibras dietéticas insolúveis têm como principal função aumentar o volume e o peso fecal, tornam também as fezes mais macias, estimulando o peristaltismo do intestino. Regulam ainda, o tempo de permanência, ou seja, existe um aumento da frequência de defecação e verifica-se uma redução do tempo do trânsito intestinal (Marcfarlane *et al.*, 2006).

Os prebióticos são compostos que não são digeridos pelas enzimas digestivas endógenas e que promovem o desenvolvimento selectivo da população microbiana benéfica do tracto gastrointestinal (Saulnier *et al.*, 2009). O efeito prebiótico das AX está relacionado com o seu peso molecular. Os resultados de Hughes *et al.* (2007) mostram que as bifidobactérias fermentam as AX de 354 kDa e 278 kDa, enquanto as AX de 66 kDa são



fermentadas pelas bifidobactérias e pelos lactobacilos. Porém, o efeito prebiótico está dependente da presença de outros polissacarídeos e do tipo de substituição do resíduo de L-arabinose (Pastell *et al.*, 2009b) na cadeia da xilana.

Existem alguns estudos em que as AX exibem actividade imuno-estimuladora *in vitro* e *in vivo* (Ghoneum & Gollapudi, 2003; Ogawa *et al.*, 2005). A actividade imunoestimuladora de compostos como as AX e seus oligossacarídeos pode ser avaliada através da proliferação de linfócitos na corrente sanguínea e na linfa (Pandima *et al.*, 2003). As AX extraídas do farelo do arroz tratadas enzimaticamente por uma mistura de carbo-hidrolases extraídas do cogumelo *Shiitake* estimulam a actividade do sistema imunitário, especialmente a actividade de um tipo de linfócitos, as células “Natural Killer”, o que promove a apoptose das células de leucemia (Ghoneum & Gollapudi, 2003).

No estudo realizado por Ogawa *et al.* (2005) concluiu-se que as arabinoxilanas das cascas do milho possuem diversas actividades imunoestimuladoras, nomeadamente com acção imuno-estimulante.

1.3. Dreche cervejeira

A dreche cervejeira, muitas vezes também designada como “resíduo de malte” ou “bagaço de malte”, constitui o principal subproduto gerado durante o processo de produção de cerveja. Em termos genéricos, pode-se dizer que a dreche cervejeira corresponde à fracção insolúvel do mosto, sendo essencialmente constituída pelas partes fibrosas (as cascas) dos grãos da cevada maltada, utilizados como principal matéria-prima na produção de cerveja. A dreche é separada do mosto por filtração, após a fase de “brassagem”.

A cevada é o cereal utilizado em maior escala na indústria cervejeira como material de partida para a maltagem, para posteriormente ser usada no processo cervejeiro (Celus *et al.*, 2006, Anker-Nilssen *et al.*, 2008). Outra aplicação para o uso da cevada consiste na alimentação animal (Carvalho *et al.*, 2004; Celus *et al.*, 2006).

O grão de cevada possui como constituintes maioritários os polissacarídeos e as proteínas. Dentro dos polissacarídeos, o maioritário é o amido, e em menores quantidades as arabinoxilanas (AX), as β -glucanas de ligação mista e a celulose. Na **Tabela 2** está apresentada a composição química do grão da cevada, relativamente ao peso seco do grão.

**Tabela 2:** Composição química do grão de cevada (MacGregor, 1993)

Constituintes	Teor (% peso seco)
Amido	60-64
Arabinoxilanas (AX)	4,4-4,78
β -Glucanas	3,6-6,1
Celulose	1,4-5,0
Carboidratos simples (glucose, frutose, sacarose e maltose)	0,41-2,9
Oligossacarídeos (rafinose, fructosanas)	0,16-1,8
Proteínas	8-15
Lípidos	2-3
Minerais (Cinzas)	3-3

Os grãos de cevada contêm pequenas quantidades de vitaminas do complexo B, vitamina E, minerais e compostos fenólicos (MacGregor, 1993).

As AX e as β -glucanas do grão da cevada encontram-se distribuídas pelos diferentes tecidos e em diferentes quantidades devido às diferentes funções que desempenham quer estruturais quer de reserva.

Na **Figura 3** pode-se observar em pormenor os diferentes tecidos que constituem o grão de cevada, enquanto, na **Tabela 3** está apresentada a composição química do material polissacarídico e a respectiva quantidade em massa, existente nas paredes celulares dos tecidos que compõem os grãos de cevada.

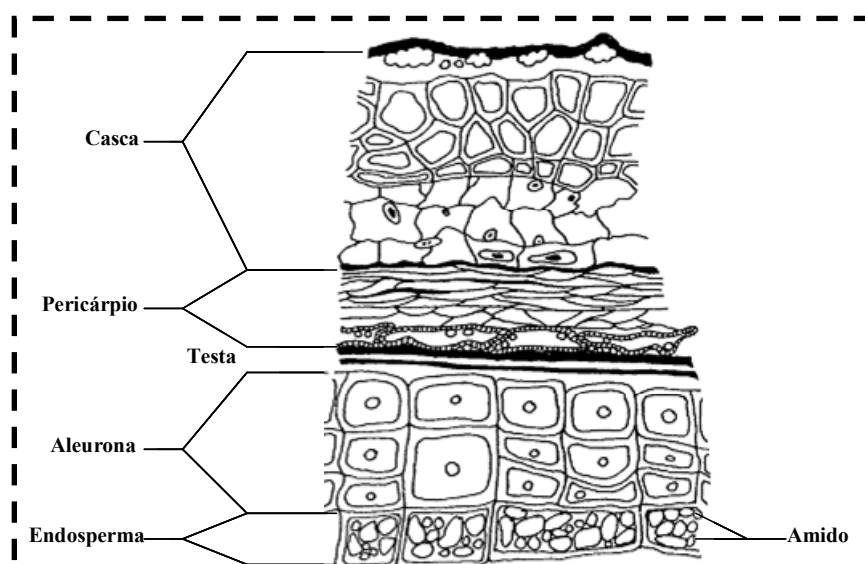
**Figura 3:** Anatomia do grão de cevada (Kent, 1983; Jadhav et al., 1998)



Tabela 3: Composição do material polissacarídico das diferentes paredes celulares dos tecidos que compõem o grão de cevada.

Paredes Celulares	Casca	Endosperma	Aleurona
Polissacarídeos	AX (46%) ^[1] Celulose (21%) ^[1] (1→3, 1→4) -β-Glcp (8%) ^[1]	(1→3, 1→4) -β-Glcp (70%) ^[2] AX (25%) ^[2] Celulose (2%) ^[2] Glucomananos (2%) ^[2]	(1→3, 1→4) -β-Glcp (26%) ^[3] AX (67-71%) ^[3]
Rácio Ara/Xyl	0,20 ^[1]	0,92 ^[3]	0,57/0,66 ^[3]

Referências

^[1] Höije *et al.*, 2005

^[2] Lazaridou *et al.*, 2008

^[3] Bacic & Stone, 1981a; 1981b

Segundo os resultados obtidos por Höije *et al.* (2006) da análise estrutural por RMN de ¹H e ¹³C, as AX das cascas da cevada são polissacarídeos com uma cadeia principal de resíduos de D-Xylp em ligações β-(1→4). As cadeias laterais apresentam dissacarídeos de β-O-D-Xylp-(1→2)α-L-Araf ligados à cadeia da xilana em ligação α-(1→3), como está ilustrado na **Figura 4**.

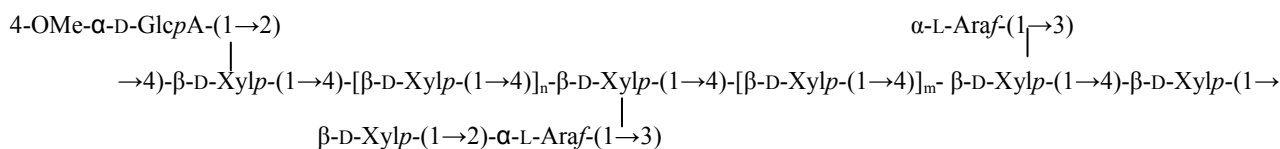


Figura 4: Estrutura de uma arabinoxilana nativa da casca da cevada segundo Höije *et al.* (2006).

As AX do endosperma da cevada são constituídas por uma cadeia principal formada por resíduos de D-Xylp em ligações β-(1→4), com ramificações laterais de L-Araf em ligação α-(1→2) ou α-(1→3) ou ambas (Izidorczyk *et al.*, 1995; Dervilly *et al.*, 2002). Estes polissacarídeos são constituídos por duas sequências distintas. A sequência maioritária consiste em resíduos de D-Xylp mono- e dissubstituídos por resíduos de L-Araf em ligações α-(1→2) ou α-(1→3) ou ambas, separados por um resíduo de D-Xylp não substituído (Han, 2000). A outra sequência consiste em dois ou mais resíduos de D-Xylp não substituídos (Han, 2000).

As β-glucanas de ligação mista são encontradas nos grãos de cevada com níveis de 3 a 8% em massa relativamente ao peso seco do grão (Ghotra *et al.*, 2008). São



encontradas em maior concentração nas paredes celulares do tecido do endosperma amiláceo do grão da cevada. Estruturalmente, as β -glucanas de ligação mista são polissacarídeos constituídos por uma cadeia linear de resíduos de D-Glcp com ligações β -(1 \rightarrow 4) e interrompidas por ligações β -(1 \rightarrow 3). Estas polissacarídeos apresentam cerca de 70% das ligações em β -(1 \rightarrow 4) e apenas 30% das ligações em β -(1 \rightarrow 3) (Campell *et al.*, 1993; Biliaderis & Izydorczyk, 2006). São maioritariamente encontrados na forma de blocos de celotriosídeos e celotetraosídeos ligados entre si através de ligações β -(1 \rightarrow 3). Sequências mais longas de ligações β -(1 \rightarrow 4) compostas de blocos de celopentaosídeos ou celo-hexaosídeos têm também sido identificadas em cereais (Johansson *et al.*, 2006; Lazaridou *et al.*, 2007).

A **Figura 5** pretende representar esquematicamente o processo de maltagem e do fabrico do mosto cervejeiro, que utiliza os grãos de cevada como matéria-prima, sendo a dreche o resíduo resultante do processo.

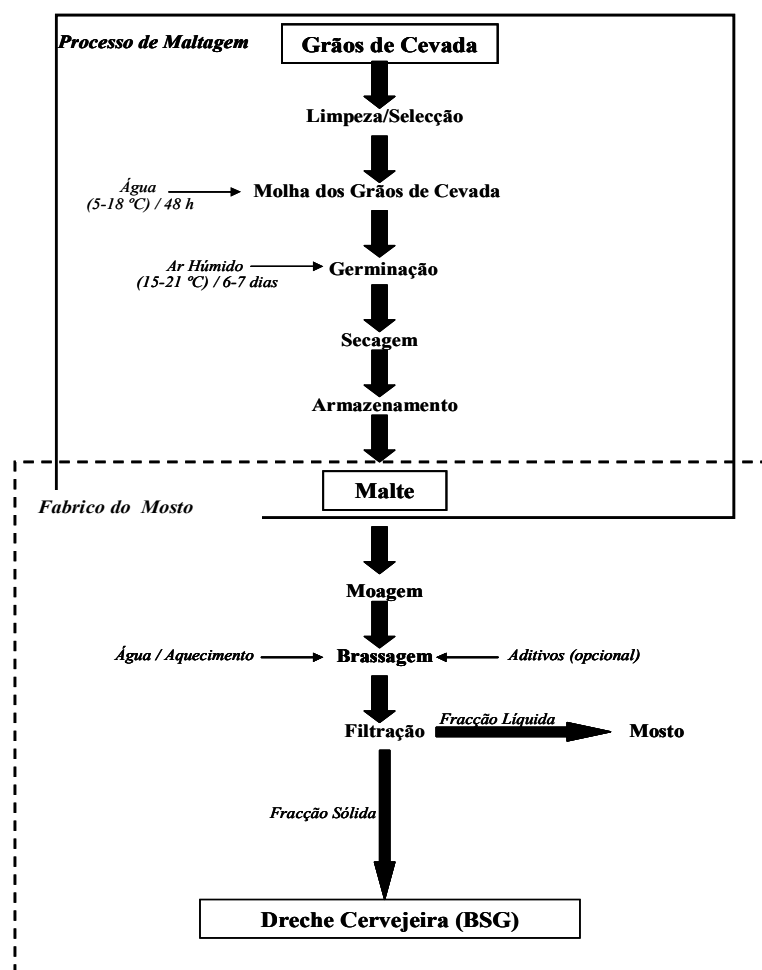


Figura 5: Representação esquemática do processo que permite obter a dreche cervejeira a partir dos grãos de cevada (Mussatto *et al.*, 2006).



A maltagem é um processo de germinação controlado dos grãos de cevada (Guiga *et al.*, 2008) que engloba diversas etapas, nomeadamente, a selecção e limpeza do grão, a molha dos grãos de cevada, a germinação, a secagem e o armazenamento.

A demolha dos grãos de cevada é a etapa que permite que as células do tecido de aleurona produzam enzimas hidrolíticas como β -endoglucanases, proteases e α -amilases que são transportadas para o endosperma durante a germinação (Lewis & Young, 1995). A acção das α -amilases permite a conversão do amido insolúvel em açúcares fermentáveis. As β -glucanas de ligação mista são degradadas enzimaticamente pelas β -endoglucanases. Consequentemente, as paredes celulares do tecido do endosperma amiláceo dos grãos de cevada são degradadas porque apresentam como constituinte maioritário as β -glucanas de ligação mista (**Tabela 3**); o segundo polissacarídeo em maior quantidade em termos de massa são as AX. As AX do tecido do endosperma amiláceo dos grãos de cevada não são degradadas, e como as paredes celulares deste tecido são destruídas, as AX ficam mais acessíveis para serem extraídas (Cyran *et al.*, 2002; Dervilly *et al.*, 2002).

Na maltagem, os complexos proteicos são hidrolisados a aminoácidos livres pela acção das proteases. A glucose e os aminoácidos livres gerados na maltagem servem como substrato para as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), que são adicionadas na preparação do mosto de forma a dar início à etapa de fermentação.

A maltagem dá-se por terminada com o aparecimento da radícula no grão de cevada, sendo o teor de β -glucanas de ligação mista vestigial. Se assim não fosse, tornariam o mosto viscoso e dificultariam a filtração (Cyran *et al.*, 2002).

A etapa final do fabrico do mosto é a filtração que permite a separação da fracção líquida, que corresponde ao mosto, das cascas. São estas cascas que são designadas por dreche ou BSG (sigla inglesa, Brewers' Spent Grain). De seguida, a dreche é lavada com água quente para extrair o máximo de açúcares fermentáveis produzidos enzimaticamente. Nesta etapa, algumas AX são extraídas para o mosto.

A dreche contém como componente maioritário a água. Da matéria orgânica, os componentes maioritário são os polissacarídeos e em menor quantidade as proteínas que não foram totalmente degradadas pelas proteases durante a maltagem. Dentro dos polissacarídeos, os componentes maioritários são as AX e a celulose e vestígios de β -glucanas de ligação mista.



Comparando a composição do material polissacarídico da dreche com o das paredes celulares do grão de cevada, verifica-se um enriquecimento em AX. A composição química da dreche diverge de amostra para amostra (Oscarsson *et al.*, 1996), o que pode ser observado na **Tabela 4**. Os factores que influenciam a variabilidade da composição química da dreche devem-se à variedade da cevada, ao tempo de colheita, às condições de maltagem e brassagem e à qualidade e aos aditivos adicionados no processo cervejeiro (Öztürk *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003).

Tabela 4: Composição química da dreche e a variabilidade entre estudos

Componentes % peso seco	BSG [1]	BSG [2]	BSG [3]	BSG [4]
Celulose	9	N.d.	25,4	16,8
Arabinoxilanas (AX)	19	N.d.	21,8	28,4
Proteína	31	24,2	24,0	15,2
Cinzas	4	3,4	2,4	4,6
Lípidos	9	3,9	10,6	N.d.
Amido e β-Glucanas	12	N.d.	N.d.	N.d.
Lenhina	16	N.d.	11,9	27,8

Referências

[1] Prentice & Resfguard, 1978

[2] Kanauchi *et al.*, 2001

[3] Carvalheiro *et al.*, 2004

[4] Mussato *et al.*, 2005

N.d.- Não determinado

As AX da dreche são constituídas por uma cadeia principal formada por resíduos de D-Xylp em ligações β -(1 \rightarrow 4), com ramificações laterais de L-Araf em ligações α -(1 \rightarrow 2) ou α -(1 \rightarrow 3) ou ambas; estruturalmente são idênticas as AX que se encontram na casca da cevada. É ainda possível encontrar AX estruturalmente semelhantes às da parede do tecido do endosperma amiláceo e das do tecido do aleurona do grão da cevada, pelo facto da dreche pode conter resíduos destes dois tecidos (Jay *et al.*, 2008).

1.4. Métodos de extracção das arabinoxilanas

Nos últimos anos, as AX dos cereais revelaram-se como uma importante classe de produtos naturais bioactivos. Uma vasta gama de AX, AXOS e XOS exibem actividade



actividade prebiótica e actividade imunomodulatórias, tal como atrás referido. Por isso, torna-se relevante investigar métodos de extracção mais eficientes que permitam obter AX, AXOS e XOS.

Os métodos de extracção de AX estão condicionados pelas suas características estruturais que determinam as propriedades físico-químicas, nomeadamente a solubilidade em água, propriedades de viscosidade, de hidratação e de gelificação (Saulnier *et al.*, 2007). Assim, as AX podem ser extraídas com água e com combinação de temperatura de 40 °C e de 65 °C (Izdorczyk *et al.*, 1998a). Contudo, existem outras AX que fazem parte da malha polimérica e que são extraídas com soluções de reagentes alcalinos (Izdorczyk *et al.*, 1998b), de bases fortes como o hidróxido de potássio, entre 0,5 M, 1 M e 4 M (Mandalari *et al.*, 2005), ou hidróxido de sódio a 1 M (Höije, *et al.*, 2006) desprovidas de oxigénio, na presença de boro-hidreto de sódio, para evitar a degradação por reacções de “peeling” (Höije *et al.*, 2005). O meio alcalino promove a hidrólise das ligações éster e a ruptura das ligações por pontes de hidrogénio entre a celulose e as AX, que estão fortemente associadas (Coimbra *et al.*, 1996). O acesso dos reagentes alcalinos para a extracção das AX nas cascas dos cereais é difícil devido à malha do material lenho-celulósico. As AX das cascas dos cereais estabelecem associações entre a lenhina e a celulose e, para aumentar a extractabilidade das AX, é necessário que ocorra degradação por oxidação da estrutura lenho-celulósica. Diversas técnicas de pré-tratamento têm sido desenvolvidas para aumentar a acessibilidade dos reagentes alcalinos ou de enzimas às AX do material lenho-celulósico com o objectivo de as solubilizar, separando-as desta biomassa constituída por celulose, AX e lenhina. Destas, as mais utilizadas são: a moagem, que permite reduzir o tamanho de partícula, a deslenhificação das cascas dos cereais por reagentes oxidantes como o hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogénio, oxigénio, cloro e permanganato de potássio nos processos convencionais de oxidação química; pré-tratamentos por hidrotermólise assistida por micro-ondas (Roos *et al.*, 2009; Rose *et al.*, 2010) e pré-tratamento a vapor Tang *et al.*, 2005; Palmqvist *et al.*, 2006 e Krawczyk *et al.*, 2008), que permitem reduzir o tamanho e abrir a malha lenho-celulósica (Moiser *et al.*, 2005).

Muitos estudos têm sido realizados para aumentar a eficiência de extractabilidade das AX em resíduos industriais, como o farelo de trigo proveniente da panificação e da dreche da indústria cervejeira, como fontes de produtos naturais bioactivos.



Um estudo realizado por Hollmann & Lindhauer (2005) teve como objectivo principal o desenvolvimento de um processo economicamente viável para a extracção das AX do farelo de trigo numa escala piloto. Para este processo ser viável é necessário encontrar um método de extracção que permita obter AX com bons rendimentos e com elevado grau de pureza. O aumento do rendimento da extracção das AX do farelo de trigo neste estudo foi conseguido através da moagem (pré-tratamento), o que permitiu o aumento da área superficial de contacto entre as partículas do farelo de trigo com as soluções que permitiram extrair as AX solúveis em água, com combinação de temperatura. As AX da malha lenho-celulósica foram extraídas com soluções alcalinas contendo peróxido de hidrogénio como reagente oxidante, à semelhança de outro estudo de extracção de AX da cevada realizado por outros autores (Sun & Sun, 2002). A abertura da estrutura lenho-celulósica deveu-se a oxidação da lenhina, ficando assim as AX mais acessíveis à extracção. O elevado grau de pureza conseguido no estudo realizado por Hollmann & Lindhauer (2005) deveu-se ao pré-tratamento do farelo de trigo com uma solução de etanol a 70 % (v/v) a 80 °C com agitação durante 4 horas. Este pré-tratamento teve a vantagem de eliminar compostos fenólicos, carbo-hidratos de baixo peso molecular e gordura a fim evitar a contaminação das AX a extrair com este tipo de compostos. As AX neste estudo foram recuperadas por precipitação em etanol, mas também podem ser recuperadas por precipitação sequencial com sulfato de amónio (Izydorczk *et al.*, 1995).

Os diferentes métodos de extracção levam a AX, AXOS e XOS estruturalmente diferentes, o que se relaciona com propriedades químicas distintas, o que permite diversidade de aplicações nutracêuticas.

1.5. Relevância e objectivos do trabalho

Atendendo à abundância das AX na dreche, e à semelhança estrutural entre as AX do farelo de trigo, torna-se relevante estudá-las como fonte de materiais bioactivos com actividades semelhantes às descritas para as AX do farelo de trigo.

A dreche representa cerca de 85% (m/m) dos subprodutos produzidos em indústrias cervejeiras (Mussatto *et al.*, 2006). Têm sido propostas várias soluções para o seu aproveitamento, nomeadamente, a utilização como fertilizante, combustível, como fonte de

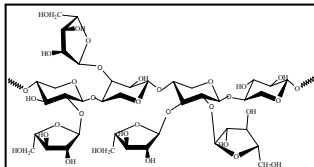


alimentação animal (Öztürk *et al.*, 2002) ou como ingrediente alimentar no fabrico do pão (Stojceska *et al.*, 2008a) e de snacks (Ainsworth *et al.*, 2007; Stojceska *et al.*, 2008b).

O trabalho desta dissertação pretende a valorização da dreche, subproduto da indústria cervejeira, que passa pela extracção de compostos que possam ser valorizados pelas suas possíveis propriedades nutraceuticas. Neste contexto, o presente trabalho visa o isolamento e caracterização estrutural das AX da dreche utilizando diferentes processos de extracção, nomeadamente, água, soluções de KOH e tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas. Serão atingidos os seguintes objectivos:

1. Conhecimento da composição química da fracção fibrosa da dreche: determinação da quantidade de água, cinzas, lípidos, proteína e polissacarídeos. Com base na composição em açúcares, determinar a quantidade em AX, glucanas não celulósicas e celulose.
2. Confirmação dos rendimentos de extracção das AX com soluções de KOH descritos na bibliografia.
3. Isolamento e caracterização estrutural das AX presentes nas fracções obtidas da dreche por extracção com água, com soluções de KOH e por tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas.
4. Optimização das condições de extracção das AX por tratamento alcalino ao nível da concentração e volume de solução de KOH, assim como a temperatura e o tempo de extracção.
5. Proposta de uma metodologia de extracção com soluções de KOH que seja rentável e que permita extrair as AX da dreche com bons rendimentos economicamente sustentáveis.

Capítulo II



Material & Métodos





Capítulo II – Material & Métodos

2. Amostras

2.1 Amostragem e identificação dos cinco lotes de dreche

As amostras de dreche foram fornecidas pela Unicer – Bebidas de Portugal, S.A., de acordo com a identificação e calendarização referida na **Tabela 5**.

Tabela 5: Identificação dos lotes de dreche, datas de recolha e de receção.

Identificação dos Lotes	Data da Recolha (Unicer)	Data da Receção (UA)
L080109	08/01/2009	09/01/2009
L270109	27/01/2009	03/02/2009
L090209	09/02/2009	12/02/2009
L250209	25/02/2009	26/02/2009
L090309	09/03/2009	17/03/2009

Inicialmente, tinha-se definido a recolha de três amostras A, B e C de um determinado lote que viria identificado com a data de recolha e as letras corresponderiam as diferentes partes da descarga do silo. A letra A corresponderia ao início da descarga, a B corresponderia ao meio do silo e a C ao final. A Unicer forneceria estas amostras com uma periodicidade de 15 dias entre elas durante três meses, num total de 15 amostras. De acordo com a empresa, não foi possível a recolha das três amostras por lote devido a este ser um período de menor produção. Assim, o número de lotes estudados foi de cinco, mas somente de uma amostra cada, tendo esta sido definida como representativa da dreche do silo. Os lotes de (L080109, L270109, L090209, L250209) foi proveniente do processo de cerveja SuperBock, enquanto que o lote L090309 era proveniente de produção de Calsberg (100% malte). O lote L090209 apresentava uma granulometria superior às restantes. O malte foi obtido da mesma variedade de cevada (variedade da Primavera).

2.2. Acondicionamento dos cinco lotes de dreche

Todos os lotes de dreche foram armazenados em sacos de plástico fechados sob vácuo, e conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, até ao momento das análises químicas, excepto para a determinação da quantidade de água de cada lote, que foi realizada na data da receção.



2.3. Extracção de AX da dreche

2.3.1. Extracção sequencial das AX da dreche com solventes aquosos

A metodologia usada para a extracção sequencial das AX da dreche consistiu na utilização de solventes aquosos, nomeadamente, água e soluções de hidróxido de potássio (KOH) de concentração crescente (0,1; 0,5; 1 e 4 M), designada por **Extracção Sequencial A**.

As AX da dreche foram extraídas por extracção sequencial com: **(1)** 500 mL de água destilada, com metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Panreac, PA) a 5 mM a pH 6,8 sob agitação, à temperatura ambiente e durante 2 h; **(2)** 500 mL de água destilada a 80 °C, sob agitação durante 30 min; **(3)** 500 mL de (KOH (Pronalab) a 0,1 M + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 5 mM) sob agitação e em atmosfera de azoto e à temperatura ambiente durante 2 h; **(4)** 500 mL de (KOH a 0,5M + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 5mM) sob agitação e em atmosfera de azoto e à temperatura ambiente durante 2 h; **(5)** 500 mL de (KOH a 1M + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 5 mM) sob agitação e em atmosfera de azoto e à temperatura ambiente durante 2 h; **(6)** 500 mL de (KOH a 4M + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 5mM) sob agitação e em atmosfera de azoto e à temperatura ambiente durante 2 h (**Figura 6**).

As extracções com as soluções de KOH ocorreram na ausência de oxigénio, e para tal as soluções do reagente alcalino foram preparadas a partir de água previamente fervida durante 1 h e arrefecida sob uma corrente de azoto. As soluções de KOH foram preparadas de imediato antes de cada extracção, decorreram com agitação e sempre sob uma atmosfera de azoto de forma a garantir a ausência de oxigénio.

Depois de cada extracção com água e com as soluções de KOH o resíduo insolúvel foi separado por centrifugação (Sigma, rotor 12159, 24652 g, 20 min, 4 °C), seguindo-se uma filtração do extracto aquoso, através de um filtro de fibra de vidro (Filtros Anolia-GF/B). Os extractos de KOH foram acidificados a pH 5 com ácido acético glacial (Carlo Erba, 99%) e concentrados a pressão reduzida no evaporador rotativo (Buchi Waterbath B-480) a uma temperatura de 30 °C, de forma a evitar reacções que pudessem degradar a estrutura dos polissacarídeos extraídos.



Todos os extractos foram dialisados a 4°C durante, pelo menos, 4 dias e no mínimo com 8 mudas de água, com adição de algumas gotas de clorofórmio e tolueno para evitar o crescimento microbiológico. Através da diálise foram eliminadas todas as moléculas de baixo peso molecular (membrana de diálise com exclusão de 12-14 kDa, segundo o fabricante). Depois da diálise, os extractos de KOH foram concentrados e eventuais precipitados formados foram separados por centrifugação (Sigma, rotor 12159, 24652 g, 20 min, 1 °C), dando o material insolúvel origem às fracções (“Pp KOH”) e o sobrenadante às fracções (“Sn KOH”) (**Figura 6**). O resíduo final obtido após a extracção sequencial foi suspenso em água destilada, acidificado com ácido acético glacial a pH 5 e dialisado. A fracção que passou para o sobrenadante com a diálise (“SnCR”) foi separada por centrifugação do resíduo insolúvel (“CR- Cellulosic Residue). Todas as fracções foram congeladas a -20°C e liofilizadas.

Foram experimentadas outras extracções sequenciais, designadas por B, C e D, em que foram apenas utilizados 500 mL das soluções de KOH a 0,5 e 4 M para a mesma quantidade de dreche. O que difere nestas extracções é ausência ou a presença de pré tratamento antes das extracções. Desta forma a extracção sequencial B corresponde a dreche sem qualquer tipo de pré-tratamento, enquanto na extracção C houve a preparação de um resíduo insolúvel em álcool (AIR) a partir da deche. A extracção D consistiu na preparação do AIR com posterior deslenhificação com hipoclorito de sódio e ácido acético.

A preparação do AIR da dreche realizada no procedimento C consistiu em adicionar etanol à dreche até perfazer uma solução de etanol a 80% (v/v), que foi refluxada durante 30 min. O resíduo foi filtrado por um funil com placa sinterizada de poro G2 e lavado com 230 mL de água. Nesta fase, retirou-se uma pequena quantidade de AIR para posteriormente ser analisado em termos de açúcares.

Para a realização do procedimento D, a 20 g de AIR de dreche foram adicionados 200 mL de lixívia comercial (5% de NaClOH) mais 240 µL de ácido acético ao AIR a temperatura de 70 °C durante 15 minutos e filtrou-se por um funil com placa sinterizada de poro G2. Voltou-se a repetir novamente o procedimento da deslenhificação. O AIR deslenhificado foi lavado 3×200 mL com água. A água de lavagem foi adicionada aos 400 mL da solução da deslenhificação e a solução foi concentrada a pressão reduzida. O extracto de NaClOH foi dialisado.



Foram ainda testadas extracções à temperatura ambiente durante 24 h com as soluções de KOH de 0,1, 0,5 e 4 M e também foram testadas extracções com as mesmas soluções mas à temperatura de 40 °C durante 2 h.

Para as condições de extracção durante 24 h à temperatura ambiente, foram ainda testadas condições em que se reduziu o volume do reagente alcalino para um terço. Para a acidificação dos extractos, utilizou-se uma solução de ácido cítrico saturada e as arabinoxilanas da dreche foram recuperadas por precipitação em etanol a 70 % (v/v).

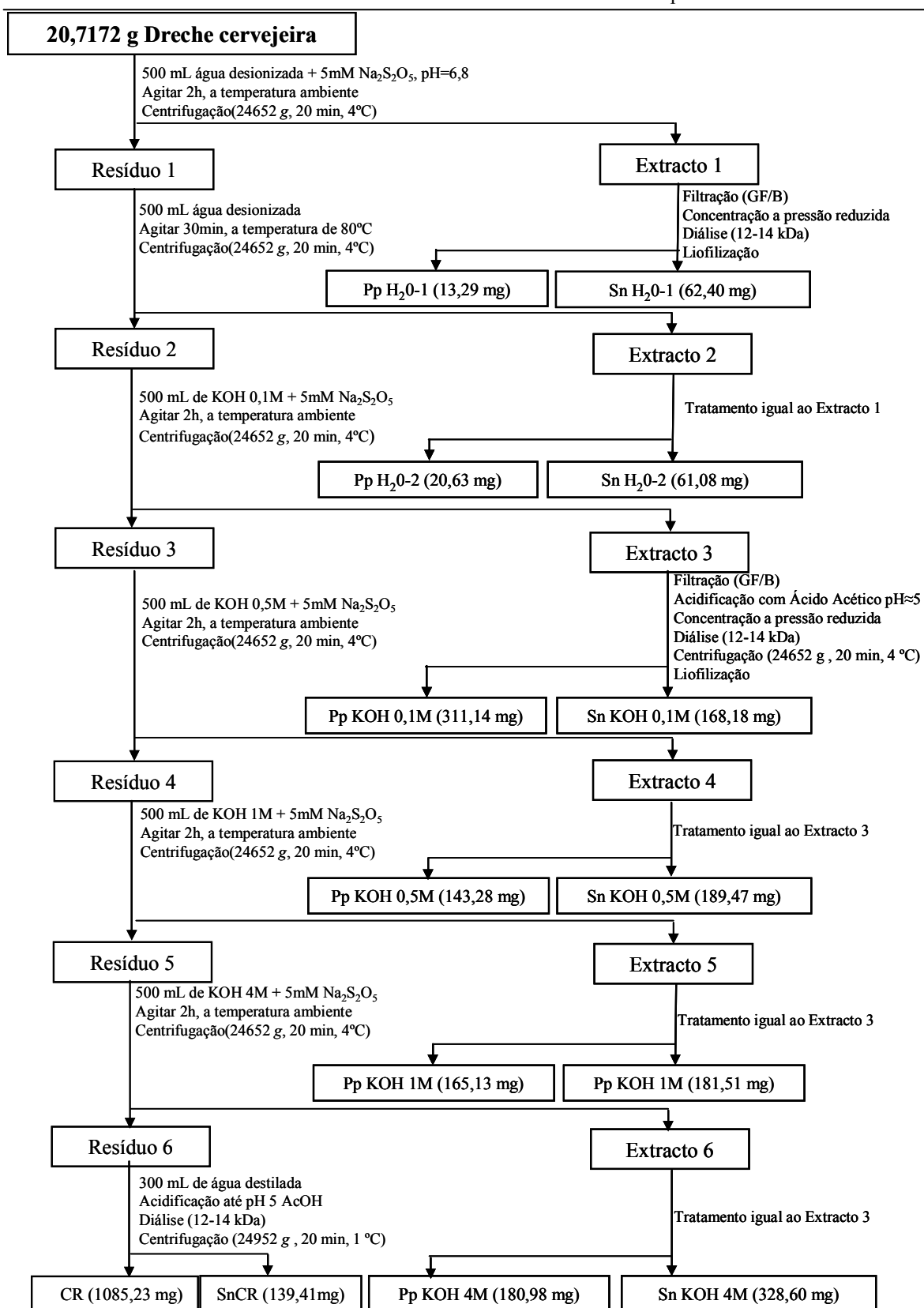


Figura 6: Fluxograma da extracção sequencial A das AX da dreche com água, água quente e soluções alcalinas (KOH) de concentração crescente



2.3.2. Extração de AX da dreche por tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas

Com o objectivo de extrair as AX da dreche apenas com água recorreu-se a um tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas (Roos *et al.*, 2009; Rose *et al.*, 2010) na tentativa de possibilitar a abertura da estrutura lenho-celulósica (Mosier *et al.*, 2005) de modo a facilitar a extração das AX.

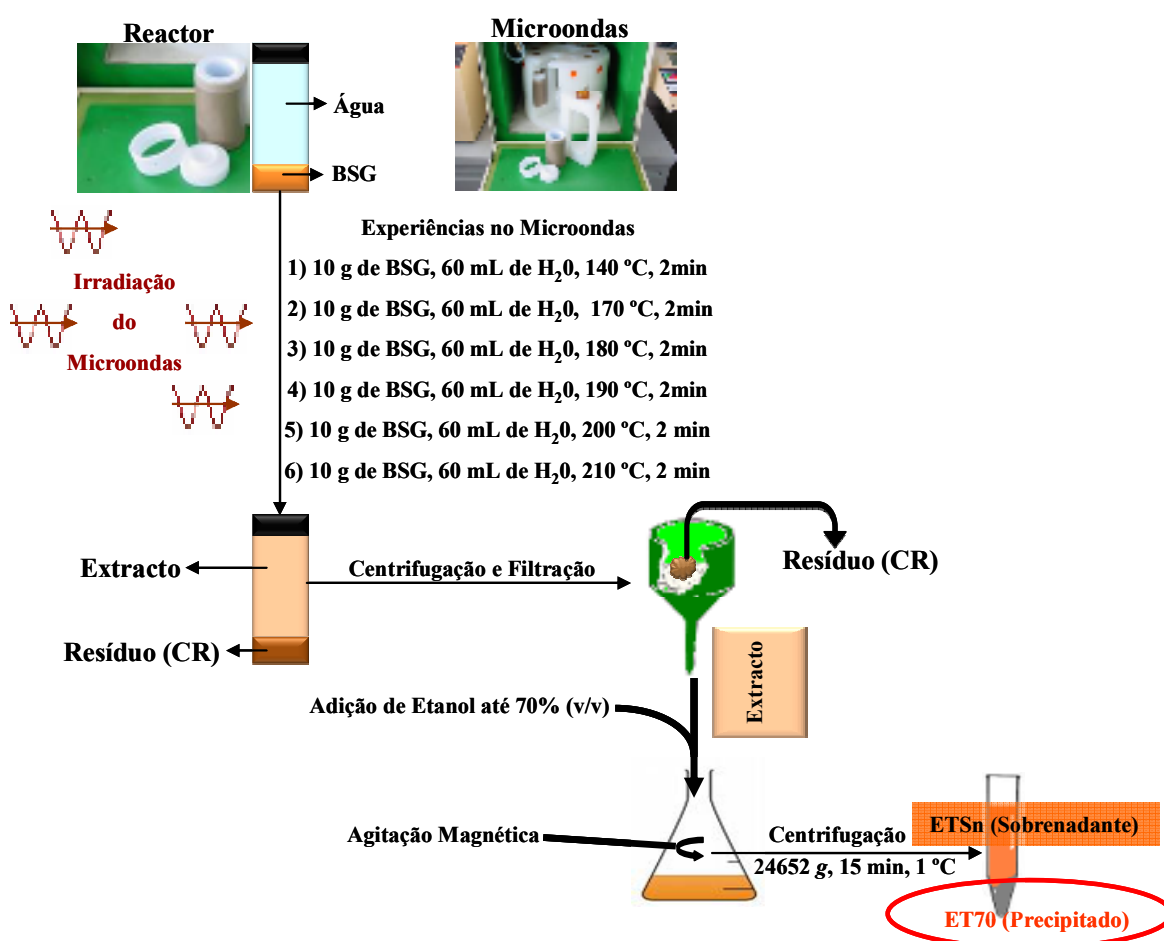


Figura 7: Esquema experimental do processo de extração de AX da dreche por tratamento hidrotérmico utilizando a irradiação por microondas. Para cada experiência foram obtidas 3 fracções: “ET70”, “ETSn”, “CR.”.

A **Figura 7** apresenta o esquema experimental do processo de extração das AX da dreche por tratamento hidrotérmico utilizando o microondas (MicroSYNTH Labstation for



Synthesis, cedido pelo grupo de Química Orgânica). Foram realizadas 6 experiências distintas com 10 g de dreche em 60 mL de água. As temperaturas escolhidas para a extracção foram de 140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C. A potência máxima utilizada no aparelho de micro-ondas foi de 850 watt. Cada experiência realizada durou 2 min em que a dreche e a água estavam contidos no reactor do microondas em vaso fechado com agitação. A temperatura e a pressão foram controladas durante a realização de cada experiência. Para cada experiência realizaram-se dois ensaios e o pH da solução foi medido antes e depois do tratamento hidrotérmico.

Após decorrido o tempo de tratamento hidrotérmico para as diferentes experiências, o resíduo celulósico foi separado do extracto por centrifugação (26452 g, 15 min, 4°C) e filtração sob vácuo (**Figura 7**).

Os extractos foram precipitados em etanol até 70 % (v/v). Separou-se o precipitado (“ET 70”) obtido do sobrenadante (“ETSn”) por centrifugação (26452 g, 15 min, 1°C). O etanol foi removido por evaporação a pressão reduzida das fracções “ET 70” e “ET Sn”). Todas as fracções e todos “CR” foram congelados e liofilizados.

2.4. Análises químicas

2.4.1. Determinação da quantidade de água pelo método da secagem em estufa

A quantidade de água para as diferentes amostras foi determinada, em quintuplicado, pelo método gravimétrico (Wroslstad *et al.*, 2005).

As caixas de pesagem foram previamente secas na estufa (Binder) a 105 ± 3 °C durante 2 h. Após decorrido o tempo de secagem as caixas de pesagem foram arrefecidas no exsicador com pentóxido de fósforo (P_2O_5).

Pesou-se rigorosamente numa caixa de pesagem 5 g de dreche e a quantidade de água foi determinada por diferença do peso antes e depois do aquecimento a 105 ± 3 °C na estufa durante 6 h. As amostras foram arrefecidas no exsicador. A determinação de humidade foi dada por terminada sempre que após três pesagens (intercalando secagem e arrefecimento), a massa se mantinha constante.



A diferença entre o peso da amostra e a massa obtida após a secagem corresponde à perda de peso da amostra por evaporação da água. A quantidade de água ou humidade foi quantificada pela seguinte expressão. $\%Humidade = \frac{perda\ de\ peso}{peso\ da\ amostra} \times 100$

2.4.2. Determinação da quantidade de cinzas pelo método da mufla

A determinação da percentagem de cinzas (1 g de amostra seca) foi determinada por diferença de peso antes e depois da incineração a 650 °C na mufla (Select-Horn) durante 24 h (Wroslstad *et al.*, 2005). As amostras, após a incineração, foram arrefecidas no exsiccador durante 2 h. A percentagem de cinzas das diferentes amostras foi determinada em triplicado.

2.4.3. Determinação da quantidade de lípidos por extracção directa em soxhlet

Para a determinação dos lípidos (2 g de amostra seca) utilizou-se n-hexano destilado como solvente extractor, usando uma montagem de soxhlet, (Wroslstad *et al.*, 2005), tendo as amostras estado sujeitos a extracção durante 5 h. No final o solvente foi evaporado até à secura, seguindo-se o arrefecimento no exsiccador durante 30 min até obter peso constante. A percentagem de lípidos das diferentes amostras foi determinada em triplicado.



2.4.4. Determinação da quantidade de proteínas por análise elementar

O conteúdo total em azoto da amostra seca foi determinado por análise elementar utilizando o analisador Leco CHNS-932, tendo a quantidade de proteína total sido obtida por estimativa por multiplicação dos valores obtidos por 5,7 (Lazaridou *et al.*, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicado.



2.4.5. Determinação da composição de açúcares neutros e de ácidos urónicos

2.4.5.1. Análise dos açúcares neutros como acetatos de alditol por GC-FID

A conversão dos açúcares neutros numa forma volátil de acetatos de alditol foi efectuada em três etapas.

A primeira etapa consistiu na hidrólise ácida por adaptação do método proposto por Coimbra *et al.* (1996). Os polissacarídeos foram hidrolisados a monossacarídeos por hidrólise de Saeman (Selvendran *et al.*, 1979).

As duas últimas etapas consistiram em reduzir e acetilar os monossacarídeos a acetatos de alditol. A redução e a acetilação foram realizadas por adaptação do método proposto pelo Blakeney *et al.* (1983) e Harris *et al.* (1988).

Foram pesados rigorosamente entre 2 a 3 mg de amostra seca em tubos de cultura com tampas de PTFE. Foram adicionados 200 µL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, Fluka, 95-97%) a 72% (m/m) tendo-se deixado a solubilizar durante 3 h à temperatura ambiente com agitação ocasional (hidrólise de Saeman). Após este período de tempo, a amostra foi diluída com 2,2 mL de água destilada procedeu-se à hidrólise a 100 °C durante 2,5 h (H₂SO₄ 1M).

Ao fim de uma hora de hidrólise retirou-se uma alíquota de 500 µL para análise dos ácidos urónicos pelo método colorimétrico (**secção 2.4.5.2**), incubando-se a amostra por um período de 1,5 h de forma a totalizar 2,5 h de hidrólise ácida.

Após o arrefecimento à temperatura ambiente foram adicionados 200 µL de padrão interno, 2-desoxi-D-glucose (Fluka, ≥98%) (1mg / mL) a cada 1,9 mL de hidrolisado. Transferiu-se para novos tubos de cultura 1 mL da solução anterior e foram adicionados 200 µL de amoníaco a 25% (m/m) (NH₃, Fluka) para a neutralização da solução de H₂SO₄ 1M, e 100 µL de uma solução contendo 15% (m/v) de NaBH₄ (Riedel-de Haën) em NH₃ a 3M (preparada na hora) para a redução dos açúcares e formação dos respectivos alditóis. A solução foi agitada e incubada durante 1h a 30 °C. Decorrido o tempo da redução, os tubos foram arrefecidos num banho de gelo e o NaBH₄ em excesso foi eliminado com duas adições de 50 µL de ácido acético glacial (Carlo Erba, 99%).



Transferiu-se 300 μL da solução de alditóis de cada tubo para um tubo sovirel (Pirex) e foram adicionados 450 μL de 1-metilimidazol (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) (usado como catalisador) e 3 mL de anidrido acético (Fluka, $\geq 99\%$), tendo-se deixado a reagir durante 30 min a 30 °C. O anidrido acético vai reagir com os alditóis dando origem aos acetatos de alditol e a incubação a 30 °C vai favorecer esta transformação.

O anidrido acético em excesso foi eliminado por adição de 3 mL de água destilada e os acetatos de alditol extraídos por adição de 2,5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). Após agitação e centrifugação (KUBOTA 2010) a 3000 rpm, durante 1 min, para a separação de fases, a fase aquosa (camada superior) foi aspirada. Foram adicionados 3 mL de água destilada e mais 2,5 mL de CH_2Cl_2 . Após agitação e centrifugação a 3000 rpm, durante 1 min, para a separação de fases, a fase aquosa (camada superior) foi aspirada. A fase orgânica (camada inferior) foi lavada 2 vezes com 3 mL de água com o objectivo de remover completamente o 1-metilimidazol (Hoebler *et al.*, 1989).

A fase orgânica foi transferida para um novo tubo (tubo de speed vacuum), sendo o CH_2Cl_2 evaporado a pressão reduzida num concentrador de amostras (Univapo 100H). A adição de (2×1 mL) de acetona anidra (Sigma-Aldrich $\geq 99,5\%$) aos acetatos de alditol permitiu a co-evaporação de eventuais resíduos de água. Assim, adicionou-se 1 mL de acetona anidra seguida de secagem e voltou-se a repetir nova secagem com 1 mL de acetona anidra até secar. No final, a amostra foi dissolvida em 50 μL de acetona anidra e injectada no cromatógrafo com detector de ionização de chama (FID).

Os acetatos de alditol foram separados por cromatografia em fase gasosa (GC), Perkin Elmer – Clarus 400, com detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna polar intermédia, DB-225 capilar (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 μm de espessura de filme), com velocidade do gás de arraste (hidrogénio) de 1,7 mL/min. As condições de operação e do programa de temperaturas encontram-se descritas abaixo.

Condições de operação:

$V_{\text{injecção}} = 2 \mu\text{L}$ (splitless)
 $T_{\text{injector}} = 220 \text{ }^\circ\text{C}$
 $T_{\text{detector}} = 230 \text{ }^\circ\text{C}$
Range :1
Attenuation :6
Split :10 min



Programa de Temperaturas:

$t_{\text{total}} = 9 \text{ min}$
 $T_{\text{inicial}} = 220 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Rampa 1 = $40 \text{ }^{\circ}\text{C/ min}$ até $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 $T = 220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 min
Rampa 2 = $20 \text{ }^{\circ}\text{C/ min}$ até $230 \text{ }^{\circ}\text{C}$
 $T_{\text{final}} = 230 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min

Os acetatos de alditol foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões de referência. As curvas de calibração foram efectuadas para cada um dos açúcares padrão derivatizados.

A quantificação dos acetatos de alditol identificados nas amostras foi correlacionada com a área do padrão interno 2-desoxi-D-glucose (técnica do padrão interno). A quantificação da Glc não celulósica foi efectuada calculando a diferença entre o conteúdo determinado com e sem hidrólise de Saeman. Foram realizados 3 ensaios para cada amostra analisada.

2.4.5.2. Análise dos ácidos urónicos pelo método colorimétrico

Os ácidos urónicos (Ác. Ur.) foram quantificados utilizando uma adaptação de Coimbra et al. (1996) do método proposto por Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), utilizando como padrão o ácido D-galacturónico.

As alíquotas de 500 μL retiradas de cada amostra da hidrólise com ácido sulfúrico a 1 M (**secção 2.4.5.1**) ao fim de 1 h a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foram diluídas 4 vezes por adição de 1,50 mL de água desionizada. Para cada amostra transferiu-se 500 μL da solução diluída de amostra para três tubos de ensaio de 16 cm de altura previamente lavados com ácido. Os tubos foram previamente arrefecidos em gelo e foram adicionados 3,0 mL de uma solução de 50 mM de ácido bórico em ácido sulfúrico concentrado e agitados manualmente. De seguida, os tubos foram aquecidos num banho de água a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Após o arrefecimento à temperatura ambiente, a dois dos três tubos de ensaio de cada amostra foram adicionados 100 μL de uma solução de 3-fenilfenol (Aldrich, 85%) a 0,15 % (m/v) em 0,5% (m/v) de NaOH (Pronolab, PA), e ao terceiro tubo foi adicionado 100 μL de uma



solução de 0,5% (m/v) de NaOH. Todos os tubos foram deixados em repouso no escuro durante 30 min para o desenvolvimento de cor.

A absorvância foi determinada a 520 nm para as amostras e branco, e ao valor de absorvância das amostras foi subtraído o valor do branco.

A quantidade de ácidos urónicos nas amostras foi determinada utilizando uma recta de calibração utilizando ácido D-galacturónico (Merck, $\geq 99,8\%$) como padrão (200 $\mu\text{g/mL}$) por interpolação na gama de concentrações entre 0 e 13 $\mu\text{g/mL}$.

2.5. Caracterização estrutural das AX por metilação.

2.5.1. Análise de metilação

A análise de metilação foi realizada de forma a determinar a composição das ligações glicosídicas dos polissacarídeos das fracções obtidas.

As amostras foram metiladas por modificação do método de Ciucanu & Kerek (1984). Este método baseia-se na dissolução da amostra em dimetilsulfóxido (DMSO), activação dos polissacarídeos por tratamento com o carbanião metil-sufinilo, resultante da reacção com hidróxido de sódio (NaOH) sólido e sob uma atmosfera de azoto e metilação com iodeto de metilo (CH_3I). Este é um método que proporciona tempos de reacção curtos e altos rendimentos.

2.5.2. Reacção de metilação

Da amostra previamente seca na estufa de vazio na presença de P_2O_5 durante a noite foi pesado entre 1 a 2 mg num tubo de speed vacuum com tampa de rosca e com septo e foi dissolvida em 1 mL de DMSO (Riedel-de-Haën, 99%), seco em peneiros moleculares 3 Å, e em ambiente desprovido de água. A dissolução ocorreu durante a noite. Adicionou-se cerca de 40 mg de hidróxido de sódio (NaOH, Pronalab) finamente triturado em atmosfera de argon. As amostras foram deixadas a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Ao fim deste tempo adicionou-se com uma seringa 80 μL de CH_3I e deixou-se a reagir durante 20 min. A reacção terminou com adição de 2 mL de água destilada e acidificou-se o meio com uma solução de ácido clorídrico a 1 M e os polissacarídeos metilados foram extraídos



por adição de 2,5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). Após agitação e centrifugação (KUBOTA 2010) a 3000 rpm, durante 1 min, para a separação de fases, a fase aquosa (camada superior) foi aspirada. Foram adicionados 3 mL de água destilada e mais 2,5 mL de CH_2Cl_2 . Após agitação e centrifugação a 3000 rpm, durante 1 min, para a separação de fases, a fase aquosa (camada superior) foi aspirada. A fase orgânica (camada inferior) foi evaporada no concentrador centrífugo sob vácuo (UNIVAPO 100H).

Após a secagem dos polissacarídeos metilados, repetiu-se a reacção de metilação, para garantir que todos os grupos hidroxilos livres estavam metilados. Assim, adicionou-se 1 mL de DMSO e deixou-se em agitação durante 30 min e seguiu-se o restante procedimento da metilação.

2.5.3. Hidrólise, redução e acetilação das fracções metiladas

A hidrólise das fracções metiladas foi efectuada em 500 μL de solução de ácido trifluoroacético (TFA, Fluka, $\geq 98\%$) a 2 M a 121 °C durante 1 h (Harris *et al.*, 1984), sendo o ácido removido no final por evaporação sob vácuo a 40 °C num evaporador centrífugo, “UNIVAPO 100H”, até à secura.

As fracções metiladas e hidrolisadas foram reduzidas e acetiladas, a acetatos de alditol parcialmente metiladas (PMAA), de acordo com a metodologia indicada na **secção 2.4.5.1.**, sendo a única alteração na metodologia a utilização do boro-hidreto deuterado (NaBD_4 , Aldrich, 98% D), na etapa da redução dos açúcares. No final, a amostra, dependendo da concentração de açúcares, foi dissolvida com 45-1000 μL de acetona anidra e injectada no cromatógrafo com detector de espectrometria de massa (MS).

Os PMAA foram separados por cromatografia em fase gasosa (GC), com detector de espectrometria de massa (MS) com “scans” de 400-435 m/e/s e 70 eV de energia de ionização, utilizando uma coluna apolar, DB-1 capilar (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 μm de espessura de filme), com velocidade do gás de arraste (hélio) de 1,7 mL/min à pressão de 60 kPa. A injeção (0,2 μL) dos PMAA foi efectuada em modo splitless durante 1 min. As condições de operação e do programa de temperaturas encontram-se descritas abaixo.



Condições de operação:

$$V_{\text{injecção}} = 0,2 \mu\text{L (splitless)}$$
$$T_{\text{injector}} = 220 ^\circ\text{C}$$

Programa de Temperaturas:

$$t_{\text{total}} = 90 \text{ min}$$
$$T_{\text{inicial}} = 45 ^\circ\text{C}$$
$$\text{Rampa 1} = 10 ^\circ\text{C/ min até } 140 ^\circ\text{C}$$
$$T = 1400 ^\circ\text{C durante } 5 \text{ min}$$
$$\text{Rampa 2} = 0,5 ^\circ\text{C/ min até } 170 ^\circ\text{C}$$
$$T = 170 ^\circ\text{C durante } 1 \text{ min}$$
$$\text{Rampa 3} = 15 ^\circ\text{C/ min até } 280 ^\circ\text{C}$$
$$T_{\text{final}} = 280 ^\circ\text{C durante } 5 \text{ min}$$

A identificação dos PMAA foi efectuada com base na base de dados criada pelo grupo de Bioquímica da Unidade de Investigação Química dos Produtos Naturais e Agro-Florestais, designada por ACUCARES e o cálculo das quantidades molares relativas dos PMAA foi efectuado com base nas áreas obtidas pelo GC-MS.

2.6. Quantificação do material proteico

A quantificação do material proteico foi feita por soma da quantidade de aminoácidos libertados durante a hidrólise ácida.

2.6.1. Análise de aminoácidos

A conversão dos aminoácidos numa forma volátil de isobutil-N-heptafluorobutírate dos respectivos aminoácidos foi efectuada em três etapas. A primeira etapa consistiu na hidrólise ácida por adaptação do método proposto por Zumwalt *et al.* (1987). O material proteico foi hidrolisado a aminoácidos. A segunda etapa consistiu na derivatização dos aminoácidos que foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Mackenzie *et al.*, (1974) e Mackenzie *et al.*, (1987) por análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (FID).

Foram pesados rigorosamente entre 5 a 6 mg de amostras em tubos de speed vacuum com tampas roscadas de revestimento de Teflon. A cada amostra foi adicionado 1



mL de ácido clorídrico 6 M (JT Baker, 37-38%). A solução foi sonicada durante 2×15 min num banho de ultra-sons (Selecta) e colocou-se sob atmosfera de azoto e foi realizada a hidrólise durante 24 h a 110 °C num bloco de aquecimento (Techne DRI-Blok DB.3A).

Após o tempo de hidrólise, os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente e foram adicionados 500 µL de padrão interno e agitados no vortex (Labdancer). O padrão interno consistiu numa solução de norleucina (Sigma) 0,5 µM em HCl 0,1 M. A solução resultante dos tubos foi evaporada sob o vácuo a 40 °C num evaporador centrífugo até à secura. O material resultante foi dissolvido em 1 mL de HCl 0,1 M e filtrado com filtros de 0,45 µm (Whatman).

Após a filtração, o filtrado foi evaporado sob o vácuo a 40 °C num evaporador centrífugo até à secura. Após a secagem, o resíduo sólido obtido foi adicionado 200 µL de isobutanol-HCl a 3 M (Merck, 98,5%). A solução resultante foi aquecida durante 10 min e, após agitação no vortex, e foi aquecida mais 30 min. No final, os tubos foram arrefecidos até à temperatura ambiente e o excesso de reagente foi evaporado sob o vácuo a 40 °C num evaporador centrífugo até à secura. Após a secagem, ao resíduo sólido obtido foram adicionados 200 µL de uma solução de 2,6-di-tert-butilo-*p*-hidroxitolueno (BHT, Sigma) em acetato de etilo e removeu-se o solvente no evaporador centrífugo. Após remoção do acetato de etilo, adicionou-se 100 µL de anidrido heptafluorobutírico (Aldrich) e aqueceu-se a mistura reaccional durante 10 min a 150 °C. Os tubos foram arrefecidos à temperatura ambiente e o excesso de reagente foi evaporado sob o vácuo a 40 °C num evaporador centrífugo até à secura. Os derivados isobutil-N-heptafluorobutíricos dos aminoácidos foram dissolvidos em 50 µL de acetato de etilo e analisados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (FID).

Os aminoácidos derivatizados (injecção de 2 µL) foram separados por cromatografia em fase gasosa (GC), Perkin Elmer, com detector de ionização de chama (FID), utilizando uma coluna apolar, DB-1 capilar (30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 1,0 µm de espessura de filme), com velocidade linear do gás de arraste (hidrogénio) de 1,7 mL/min, em modo splitless. O programa de temperaturas do forno utilizado foi:



Programa de Temperaturas:

$$t_{\text{total}} = 61 \text{ min}$$

$$T_{\text{inicial}} = 70 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ durante 1 minuto}$$

$$\text{Rampa 1} = 20 \text{ }^{\circ}\text{C/ min até } 170 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$T = 220 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ durante 7 min}$$

$$\text{Rampa 2} = 16^{\circ}\text{C/ min até } 250 \text{ }^{\circ}\text{C} \text{ durante 5 min}$$

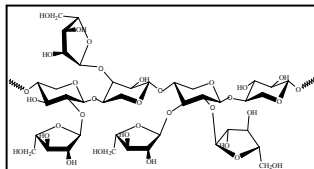
Para a identificação e quantificação dos aminoácidos derivatizados foram preparadas soluções padrão de cada um dos aminoácidos com uma concentração de 5 $\mu\text{mol/mL}$, em HCl 0,1M, à exceção da norleucina cuja a concentração foi de 1 $\mu\text{mol/mL}$ e da cisteína que foi de 2,5 $\mu\text{mol/mL}$. As soluções padrão de trabalho foram obtidas por medição de volumes que variaram entre 50 e 500 μL para os padrões de aminoácidos e de 5 mL para o padrão interno. A composição dos padrões foi obtida por aleatorização da sua composição.

A derivatização dos padrões foi realizada após a remoção de 1 mL da solução padrão de trabalho, evaporação sob o vácuo a 40 $^{\circ}\text{C}$ num evaporador centrífugo, “Speed vacuum”, até à secura e a reacção nas mesmas condições que as amostras analisar.

2.7. Análise Estatística

Os resultados obtidos da composição química foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Nos casos em que se verificaram diferenças, de forma a testar quais o grupo ou os grupos significativamente diferentes foi utilizado o teste t-student com um nível de significância de 95% (Miller & Miller, 2000).

Capítulo III



Discussão Dos Resultados Experimentais





Capítulo III – Resultados & Discussão

A apresentação e a discussão dos resultados experimentais foram organizadas em três partes. Na primeira, os resultados apresentados referem-se à determinação da composição química de cinco lotes de dreche. Este estudo permitiu verificar se existe ou não variabilidade na composição química da dreche, bem como da quantidade de AX, nos lotes de dreche fornecidos durante três meses com um espaçamento de 15 dias entre eles. Na segunda parte são apresentados os rendimentos de extracção das AX da dreche por extracção sequencial com água à temperatura ambiente e a 80 °C e com soluções de KOH de concentração crescente. As condições de extracção das AX por tratamento alcalino foram optimizadas quanto à concentração e volume de solução de KOH a usar, assim como quanto à temperatura e o tempo de extracção. Estudou-se também a aplicação de pré-tratamentos, como a preparação do resíduo insolúvel em etanol (AIR) e combinação da preparação do AIR com a deslenhificação com hipoclorito de sódio e ácido acético. Na terceira parte estudou-se a extractabilidade das AX da dreche por tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas. Foi avaliada a alteração da estrutura das AX extraídas para as diferentes temperaturas aplicadas, por comparação com as AX extraídas com os reagentes alcalinos.

3.1. Análises químicas efectuadas aos cinco lotes de dreche

A **Tabela 6** mostra a composição química dos diferentes lotes de dreche analisados quanto quantidade de água, cinzas, lípidos, proteínas e açúcares totais.

Todos os lotes de dreche apresentavam uma tonalidade bege, odor bastante agradável a cereal e uma textura pouco húmida ao toque. A quantidade de água foi quantificada pela perda de peso da amostra quando aquecida a 105°C, condições que permitiram a remoção de água livre. O resíduo obtido após a secagem foi designado de resíduo seco. A quantidade de água nos cinco lotes de dreche variou entre 73 a 76 % logo, a quantidade de resíduo seco nos cinco lotes de dreche variou entre 24 a 27%. O valor para a quantidade de água do lote L080109 foi o único que apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros lotes. O valor médio encontrado para a quantidade de água dos quatro lotes que não apresentou diferenças significativas e foi de



76%. Este valor está de acordo com a literatura, que refere valores superiores a 70% (Valverde *et al.*, 1994), entre 75 a 80% (Robertson *et al.*, 2010).

Tabela 6: Composição química resumida dos diferentes lotes de dreche analisados.

Constituintes	Lotes				
	L080109	L270109	L090209	L250209	L090309
%					
Água	72,6 ± 0,4 ^a	76,4 ± 0,2 ^b	75,1 ± 0,4 ^b	75,8 ± 0,1 ^b	76,3 ± 0,7 ^b
Massa Seca	27,4	23,6	24,9	24,2	23,7
Cinzas*	4,07 ± 0,03 ^a	3,77 ± 0,03 ^a	4,06 ± 0,03 ^a	3,58 ± 0,02 ^b	4,39 ± 0,01 ^c
Lípidos*	7,5 ± 0,6	7,5 ± 0,2	6,9 ± 0,3	7,5 ± 0,2	7,9 ± 0,1
Proteínas*	19,1 ± 0,9 ^a	24,89 ± 0,02 ^b	21,4 ± 0,5 ^c	30,6 ± 1,3 ^d	30,2 ± 0,3 ^d
Açúcares*	52,0 ± 2,6	43,4 ± 1,2	63,7 ± 2,8	50,8 ± 1,5	55,1 ± 2,7
Rha	0,02	0,11	0,19	0,15	0,17
Fuc	0,03	0,02	0,04	0,06	0,38
Ara	8,89	6,98	9,56	9,06	9,53
Xyl	17,26	13,68	15,73	15,03	17,38
Man	0,53	0,44	0,75	0,76	0,88
Gal	1,22	10,4	1,62	1,62	1,61
Glc	20,22	16,1	30,19	19,78	22,47
Ác. Ur.	3,82	4,66	5,65	4,31	3,00
Polissacarídeos*					
AX	26,2 ^a	20,7 ^b	25,3 ^a	24,0 ^a	26,9 ^a
Glucanas	10,4	7,2	13,4	7,8	4,7
Celulose	9,9	8,9	16,8	12,0	17,8
Outros	17,3	20,4	3,94	7,52	2,41
AX (kg/T dreche)	71,8	48,8	63,0	58,1	63,8

*Determinado relativamente à massa seca de dreche

^{a,b,c,d} mostram os lotes com diferenças estatisticamente significativa, aplicando t-student ($p < 0,05$).

A percentagem de cinzas dos cinco lotes de dreche variou entre 3,6 a 4,4%, apresentando os lotes L250209 e L090309 um valor médio, estatisticamente diferente dos restantes lotes, o primeiro inferior e o segundo superior. Na literatura, o valor encontrado para a quantidade de cinzas varia entre 3,4 % (Santos *et al.*, 2003) e 4,6 % (Mussatto *et al.*, 2005), estando esta gama de valores em concordância com os valores obtidos neste trabalho.



A percentagem de lípidos dos cinco lotes de dreche variou entre 7 a 8%. Estes resultados permitiram concluir que a percentagem de lípidos, em relação à massa seca, é em média, de aproximadamente 8%. O valor obtido foi concordante com a literatura, em que a quantidade de lípidos varia entre de 3,4% (Santos *et al.*, 2003) e 9% (Forssell *et al.*, 2008).

A percentagem de proteínas na dreche variou entre 19 e 30%, tendo dois lotes apresentado o valor de 30% e os restantes três variaram entre 19 a 25%. Na literatura o valor encontrado para a quantidade de proteínas varia de 15% (Mussato *et al.*, 2005) a 30 % (Kabel *et al.*, 2002), gama que inclui os valores obtidos neste trabalho.

A percentagem de açúcares totais na dreche variou entre 43 a 64%, tendo três lotes apresentado valores entre 51 e 55% e os restantes dois, um deles com um valor superior (64%, L090209) e um inferior (43%, L270109). Estes resultados mostraram que existiu alguma variabilidade de lote para lote no que respeita aos açúcares totais. A análise detalhada dos açúcares mostrou que a glucose (Glc) foi o açúcar mais abundante (16 a 30% da amostra seca). A Glc pode ser proveniente da celulose ou de outras glucanas não celulósicas. Para avaliar a origem da Glc, foi realizada uma hidrólise em que não houve pré-tratamento da amostra com ácido sulfúrico a 72%, permitindo, neste caso, obter somente a glucose proveniente das glucanas não celulósicas. Por diferença entre a glucose total e a glucose não celulósica foram obtidos os valores para a quantidade de celulose. A **Tabela 6** mostra que a quantidade de celulose variou de lote para lote, tendo sido obtidos valores de 9 a 12% em três lotes e de 17 a 18% em dois lotes. As glucanas não celulósicas, que incluem as β -glucanas assim como os resíduos de dextrinas provenientes da maltagem, variaram entre 5 e 13% (**Tabela 6**). A xilose (Xyl) e a arabinose (Ara) foram, depois da Glc, os açúcares mais abundantes na dreche. A quantidade de Xyl e Ara variou entre 14 e 17% e entre 7 e 10%, respectivamente. De acordo com estes valores, a quantidade de arabinoxilanas (AX) na dreche pode ser estimada pela quantidade de resíduos de Xyl e de Ara, assumindo que estes açúcares são provenientes unicamente das AX. Assim, a quantidade de AX na dreche variou entre 21 e 27%, estando quatro lotes compreendidos entre 24 e 27%, mostrando homogeneidade entre eles, excepto para a amostragem do dia 27 de Janeiro (L270109), que apresentou um valor ligeiramente inferior. Na literatura, o valor encontrado para a quantidade de AX varia entre 21 e 27 % (Bartolomé *et al.*, 2002), que inclui a gama de valores obtidos neste trabalho.



As análises realizadas permitiram identificar 80 a 98% do material presente na dreche seca. É possível que o material não quantificado inclua compostos fenólicos (Athanasios *et al.*, 2007) e lenhina (Mussatto *et al.*, 2007).

Pelos valores obtidos para a caracterização química da dreche verificou-se que, apesar das diferenças estatisticamente significativas encontradas, os lotes não diferem muito entre si. As diferenças verificadas para lotes de idêntica produção podem ser explicadas por variações ao nível da prensagem, do armazenamento da dreche, da recolha da amostra do silo, bem como a heterogeneidade da dreche, pelo facto desta ser constituída maioritariamente pelas cascas e por resíduos do endosperma. Esta heterogeneidade poderá ter contribuído para os resultados obtidos. No entanto, o coeficiente de variação associado aos resultados obtidos para as diferentes análises químicas foi sempre inferior a 10%, o que significa que existe repetibilidade entre os ensaios.

De acordo com os resultados obtidos, podemos estimar que, num processo industrial, uma tonelada de dreche contenha entre 49 kg e 72 kg de AX (**Tabela 6**), sendo o valor médio de 61 kg e o mais frequente de 63 kg.

3.2. Extracção de AX da dreche com solventes aquosos

As AX da dreche (L270109) foram extraídas com solventes aquosos, nomeadamente, água à temperatura ambiente e a 80 °C e com soluções de KOH de concentração crescente: 0,1; 0,5; 1 e 4 M até a obtenção do resíduo rico em celulose (“CR-A”). Os extractos de KOH foram acidificados com ácido acético glacial, observando-se a formação de um precipitado. Assim, as fracções insolúveis foram designadas de “Pp KOH-A” enquanto as que ficaram solúveis foram identificadas como “Sn KOH-A”. Esta extracção foi designada por extracção sequencial A.

Na **Tabela 7** são apresentados os resultados obtidos para o rendimento em termos de massa extraída e composição em açúcares para as diferentes fracções obtidas durante a extracção sequencial A. Verificou-se que para as diferentes fracções obtidas, aquelas com maior quantidade de massa foram os extractos com KOH 4 M (10,4%), KOH 0,1 M (9,8%), KOH 1 M (7,1%) e KOH 0,5 M (6,8%). Os extractos com água só solubilizaram 3,5% do material inicial. Após neutralização e diálise dos extractos, verificou-se que uma grande parte do material (16,4%) precipitou. No entanto, a diálise do resíduo celulósico



permitiu a solubilização de 2,9% de material polimérico (“SnCR-A”). Assim, a quantidade de material solubilizado e que permaneceu em solução após neutralização e diálise de todos os extractos da dreche foi de 20,5%.

De acordo com a bibliografia, a solução de KOH 0,1 M tem como função desesterificar as AX ligadas ao ácido ferúlico e/ou dímeros de ácido ferúlico (Fauls *et al.*, 2004) e o aumento de concentração da solução de KOH (0,5, 1 e 4 M) visa promover a ruptura das ligações por pontes de hidrogénio entre as AX, bem como entre outras interações existentes com os componentes da dreche (Coimbra *et al.*, 1996).

A **Figura 8** compara a massa extraída e a que fica no resíduo da extracção sequencial A com o estudo realizado por Mandalari *et al.*, (2005), que é designado por estudo IFR, nesta dissertação. No estudo IFR as fracções “H₂O-1-A”, “H₂O-2-A” e “KOH 0,5M-A” apresentam uma massa extraída superior à extracção sequencial A. Na extracção sequencial A foram obtidas massas superiores para os extractos com as soluções de KOH, excepto a solução de KOH de 0,5 M. Relativamente à quantidade de massa do resíduo, verifica-se que com a extracção sequencial A se consegue solubilizar uma maior quantidade de massa em comparação com o estudo do IFR.

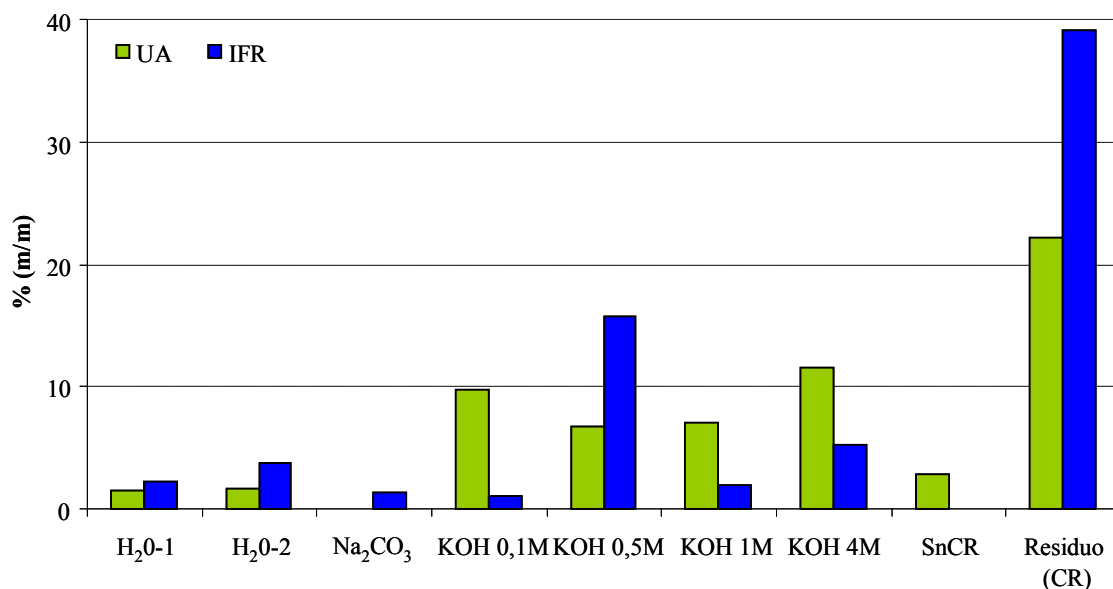


Figura 8: Massa das fracções obtidas de dreche após a extracção sequencial A obtida pela Universidade de Aveiro (UA) e comparação com os resultados da literatura (Institute of Food Research - IFR) (Mandalari *et al.*, 2005).



Tabela 7: *Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares^a do material polimérico da dreche (L270I09) das fracções obtidas pela extracção sequencial com solventes aquosos (água a temperatura ambiente, água a 80 °C e soluções de KOH de concentração crescente 0,1; 0,5; 1 e 4 M), designada por extracção sequencial A.*

Fracção	Rend ^b (%)	Açúcares existentes na dreche (% molar)								Açuc. Totais (g / 100g)
		Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc (NC)	Glc (C)	
Dreche	—	0,3 ± 0,07 ^{a,c}	0,0 ± 0,07	19,7 ± 0,1	38,6 ± 0,1	1,0 ± 0,01	2,4 ± 0,2	20,6 ± 2,5	17,4 ± 0,2	38,4 ± 0,5
H ₂ O-1										
Sn-A	1,28	1,0 ± 0,05	0,4 ± 0,1	19,9 ± 0,5	22,9 ± 0,5	1,7 ± 0,03	7,5 ± 1,3	46,5 ± 1,2	0,0 ± 0,0	21,2 ± 0,8
Pp-A	0,27	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,4	7,5 ± 0,6	85,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0	9,8 ± 0,04
H ₂ O-2										
Sn-A	1,25	1,0 ± 0,3	0,4 ± 0,2	13,4 ± 0,6	14,7 ± 0,9	1,9 ± 0,06	6,4 ± 0,2	62,2 ± 2,2	0,0 ± 0,0	29,3 ± 2,6
Pp-A	0,42	0,6 ± 0,04	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,02	0,6 ± 0,04	0,5 ± 0,02	1,2 ± 0,05	96,4 ± 0,05	0,0 ± 0,0	58,8 ± 6,2
KOH 0,1M										
Sn-A	3,44	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	39,9 ± 0,1	53,6 ± 0,08	0,4 ± 0,02	2,7 ± 0,02	3,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	68,9 ± 5,6
Pp-A	6,36	0,4 ± 0,6	0,4 ± 0,6	14,8 ± 1,5	18,2 ± 1,5	2,9 ± 0,1	7,2 ± 0,5	56,0 ± 1,1	0,0 ± 0,0	5,5 ± 0,1
KOH 0,5M										
Sn-A	3,88	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,00	30,7 ± 0,1	53,7 ± 0,3	0,3 ± 0,04	2,5 ± 0,08	12,6 ± 0,05	0,0 ± 0,0	70,5 ± 0,8
Pp-A	2,93	0,2 ± 0,03	0,0 ± 0,0	8,6 ± 0,5	34,4 ± 0,04	0,3 ± 0,04	0,7 ± 0,2	55,8 ± 0,2	0,0 ± 0,0	39,8 ± 1,2
KOH 1M										
Sn-A	3,71	0,2 ± 0,01	0,1 ± 0,0	28,0 ± 0,8	56,3 ± 0,8	0,7 ± 0,4	3,1 ± 0,07	11,8 ± 0,5	0,0 ± 0,0	65,7 ± 5,5
Pp-A	3,38	0,3 ± 0,03	0,0 ± 0,0	7,3 ± 0,3	39,5 ± 0,5	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,01	51,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0	41,6 ± 0,8
4M KOH										
Sn-A	6,72	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	29,4 ± 0,4	57,6 ± 0,01	0,5 ± 0,07	4,1 ± 0,01	8,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0	76,1 ± 4,7
Pp-A	3,70	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,0	11,1 ± 0,3	66,2 ± 0,8	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	20,2 ± 1,3	0,0 ± 0,0	36,8 ± 1,6
Resíduo pH≈ 5										
SnCR-A	2,85	0,5 ± 0,06	0,1 ± 0,01	39,6 ± 0,06	46,8 ± 0,02	0,6 ± 0,005	4,8 ± 0,2	7,6 ± 0,07	0,0 ± 0,0	31,7 ± 2,9
CR-A	22,20	0,3 ± 0,01	0,0 ± 0,01	14,2 ± 0,3	21,5 ± 0,4	1,0 ± 0,05	1,1 ± 0,1	17,3 ± 0,4	44,5 ± 0,6	71,6 ± 5,0

- ^aValores expressos em anidroaçúcares; ^bPercentagem de material extraído em cada fracção; ^c média ± desvio padrão



A análise de açúcares neutros mostra que as fracções correspondentes aos sobrenadantes obtidos das diferentes extracções são maioritariamente constituídos por Ara, Xyl, Gal e Glc e pequenas quantidades, vestigiais, de Rha, Fuc e Man (**Tabela 7**). No entanto, estas fracções apresentam diferenças na sua composição em açúcares. Assim, nas fracções extraídas com água, quer os sobrenadantes, quer os precipitados, assim como nas fracções dos precipitados de KOH, os açúcares mais abundantes são a Glc, seguido da Xyl, Ara e Gal. É possível que a elevada quantidade de Glc possa ser devida à presença de restos de amido e/ou β -glucanas não são totalmente convertidos em açúcares fermentáveis na etapa da maltagem. Nas fracções “Sn KOH 0,1M-A”, “Sn KOH 0,5M-A”, “Sn KOH 1M-A”, “Sn KOH 4M-A” e “SnCR-A”, o açúcar mais abundante é Xyl seguido pela Ara, Glc e Gal em menor percentagem, o que indica a presença de AX.

No resíduo final da extracção sequencial (“CR-A”), os açúcares mais abundantes são a Glc seguido pela Xyl e Ara; enquanto a Gal, Man e Rha ocorrem em menores percentagens. A Glc é proveniente da celulose. No entanto, a análise da quantidade de glucose não celulósica mostra que, para além da celulose, que representa 42% dos açúcares componentes do “CR-A”, estão ainda presentes β -glucanas (5%). A análise à composição de açúcares mostra ainda que as AX presentes no CR-A correspondem a 23% dos polissacarídeos deste resíduo.

Depois da caracterização das fracções em termos de açúcares neutros recorreu-se a análise de metilação, para identificar e caracterizar as ligações glicosídicas dos polissacarídeos extraídos. Os resultados estão expressos nas **Tabelas 8 e 9**, correspondendo as fracções “Sn KOH-A” e “Pp KOH-A”, respectivamente.

Na análise por metilação dos açúcares, as fracções “Sn H₂O-1-A”, “Sn H₂O-2-A”, “Pp H₂O-1-A” e “Pp H₂O-2-A” revelaram-se ricas em resíduos de Glc em ligação (1→4) (50 a 99%, molar) e Glc em posição terminal (2 a 9%, molar). Como não foram identificados resíduos de Glc ramificados, é possível que estes polissacarídeos possam ser β -glucanas (Campell *et al.*, 1993; Biliaderis & Izydorczyk, 2006). Tendo em atenção a razão entre a quantidade total de resíduos de Glc e a quantidade total de resíduos de Glc em ligação terminal, é possível estimar o grau de polimerização (DP) destes polissacarídeos, que se situam entre 6 e 55 resíduos de Glc (990 a 8928 Da). Dado que estas fracções correspondem a material polimérico de alto peso molecular proveniente da



retenção nas mangas de diálise, com limite de exclusão de 12 a 14 kDa, os valores de DP estimados pela análise das ligações glicosídicas é muito baixo.

As restantes fracções apresentam ligações características das AX com resíduos de Xyl em ligação (1→4) (9 a 73%, molar) e em posição terminal (0,3 a 6,6% molar), e sendo as ramificações das AX evidenciadas pelas ligações glicosídicas (1→2,4)-Xylp, (1→3,4)-Xylp e (1→2,3,4)-Xylp (xilitol) (0,4 a 6,1% molar; 2,9 a 11%, molar; e 2,1 a 11%, molar, respectivamente). Este tipo de ligações é característico das AX (Revanappa *et al.*, 2010; Rao & Muralikrishna, 2004; Han, 2000). O grau de polimerização estimado para os polissacarídeos destes extractos variou entre 11 e 58 resíduos de Xyl (1470 a 7674 Da). Tal como verificado para as glucanas, os DP estimados para as AX são muito baixos. É possível também que as AX possam estar ligadas a proteínas e compostos fenólicos, de forma a ficarem retidas nas membranas de diálise. No entanto, a observação de que os valores de DP estimados pela análise de metilação serem mais baixos do que o esperado já tinha sido verificada por Nunes & Coimbra (2002) para as galactomananas do café. Uma possível justificação para estes resultados pode ser devido a possíveis degradações dos polissacarídeos durante a análise de metilação, originando polissacarídeos de DP aparentemente muito pequeno. Tal não impede que a comparação entre os DP aparentes dos polissacarídeos de diferentes fracções possa ser feita (Nunes & Coimbra (2002). A comparação entre os DP das AX que precipitam e as que ficam solúveis no extracto de KOH, mostra que os DP dos precipitados são superiores aos dos sobrenadantes e que estes valores diminuem com o aumento da concentração de KOH. É possível que a diminuição do grau de polimerização das AX destas fracções seja devida à existência de reacções de degradação por oxidação e “peeling”. Para as evitar, é normalmente adicionado boro-hidreto de sódio à solução, que reduz o grupo aldeído do terminal redutor a álcool. Atendendo aos objectivos desta dissertação, nomeadamente, ao facto de se pretender propor um processo de extracção das AX da dreche para que possam vir a ser utilizadas como ingrediente alimentar, o recurso ao boro-hidreto foi evitado, tendo-se utilizado metabissulfito de sódio, um aditivo alimentar.

Para além do DP, as AX são caracterizadas também pelo seu grau de ramificação (DB). A razão entre a quantidade de resíduos ramificados de xilose e a quantidade total destes resíduos permite avaliar o DB da cadeia das xilanas. As **Tabelas 8 e 9** mostram que os DBs das AX extraídas com solventes aquosos variam entre 0,10 e 0,80. Os dados



apresentados quer na **Tabela 8** quer na **Tabela 9** mostram que a variação desta razão, ao longo da extracção sequencial com as soluções de KOH, diminui à medida que aumenta a concentração de KOH. Para todos os extractos de KOH, o DB aparente das cadeias de AX são superiores nos sobrenadantes de KOH, em comparação com os precipitados, o que está de acordo com o aumento da solubilidade das AX com o aumento do grau de ramificação.



Tabela 8: Análise de metilação (percentagem molar) das frações de sobrenadantes obtidas durante a extração sequencial A. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada fração.

Ligação Glicosídica	Frações						
	Sn H ₂ O-1	Sn H ₂ O-2	Sn KOH 0,1M	Sn KOH 0,5M	Sn KOH 1M	Sn KOH 4M	SnCR
T-Araf	20,0	9,8	28,8	20,8	22,4	20,9	20,3
2-Araf	—	—	0,6	0,7	2,0	1,7	1,8
3-Araf	—	—	1,4	1,2	2,2	2,0	3,5
5-Araf	—	—	0,7	0,4	—	—	1,4
Total	20,0^a (19,9) ^b	9,8 (13,4)	31,5 (39,9)	23,1 (30,7)	26,6 (27,9)	24,6 (29,4)	27,1 (39,6)
T-Xylp	0,5	0,2	1,7	2,8	3,9	6,4	4,8
4-Xylp	17,5	5,8	38,3	41,1	46,0	51,3	42,0
2,4-Xylp	1,7	0,9	6,1	4,6	2,8	2,6	3,8
3,4-Xylp	2,1	0,7	9,9	9,7	8,7	10,8	15,2
Xilitol	7,9	3,8	11,3	7,9	3,5	2,1	0,0
Total	29,7 (22,9)	11,4 (14,7)	67,3 (53,6)	66,0 (53,7)	64,9 (56,3)	73,2 (57,6)	65,8 (46,8)
T-Gal	—	0,9	0,3	0,4	0,2±0,3	—	0,4
Total	—	0,9 (6,0)	0,3 (2,7)	0,4 (2,5)	0,2 (3,1)	—	0,4 (4,8)
T-Glc	8,9	4,4	0,2	0,4	0,1	—	0,3
4-Glc	41,3	73,5	0,7	10,1	8,2	2,2	6,5
Total	50,4 (46,5)	77,9 (62,2)	0,9 (3,1)	10,5 (12,6)	8,3 (11,8)	2,2 (8,1)	6,8 (7,6)
Grau de Polimerização aparente (AX)	57	53	41	24	17	11	14
Grau de Ramificação aparente (AX)	0,66	0,80	0,57	0,45	0,28	0,24	0,29

^a – percentagem molar obtida por soma de todos os resíduos do mesmo glúcido obtidos por análise de metilação;

^b – percentagem molar obtida pela análise dos açúcares neutros



Tabela 9: *Análise de metilação (percentagem molar) das fracções de precipitados obtidos durante a extracção sequencial A. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada fracção.*

Ligação Glicosídica	Fracções					
	Pp H ₂ O-1	Pp H ₂ O-2	Pp KOH 0,1M	Pp KOH 0,5M	PpKOH 1M	Pp KOH 4M
T-Araf	1,3	0,1	5,3	4,1	2,8	3,2
2-Araf	—	—	0,8	0,1	0,2	0,3
3-Araf	—	—	0,6	0,1	—	0,1
5-Araf	—	—	0,8	—	—	—
Total	1,3^a (2,5) ^b	0,1 (0,7)	7,4 (14,8)	4,3 (8,6)	3,0 (7,3)	3,7 (11,1)
T-Xylp	0,4	—	1,1	0,6	1,1	2,4
4-Xylp	4,0	0,1	9,2	30,2	37,1	73,0
2,4-Xylp	—	—	1,6	0,5	0,4	0,8
3,4-Xylp	—	—	2,9	5,9	4,3	6,5
Xilitol	1,5	—	4,5	—	—	0,5
Total	5,9 (2,2)	0,1 (0,6)	19,4 (18,2)	37,9 (34,4)	42,9 (39,5)	83,2 (66,2)
4,6-Man	1,1	0,3	0,8	—	—	—
Total	1,1 (2,4)	0,3 (0,5)	0,8 (2,9)	—	—	—
T-Gal	5,2	0,1	1,9	—	—	—
6-Gal	5,1	—	1,8	—	—	—
3,6-Gal	—	—	0,5	—	—	—
Total	10,2 (7,5)	0,1 (1,2)	4,2 (7,2)	—	—	—
T-Glc	5,5	1,8	3,0	1,0	0,9	0,2
4-Glc	75,0	97,6	64,7	56,9	53,1	13,0
Glucitol	0,9	—	0,6	—	—	—
Total	81,5 (85,4)	99,4 (96,4)	68,3 (60,0)	57,9 (55,7)	54,0 (51,9)	13,2 (20,2)
Grau de Polimerização aparente (AX)	—	—	17	58	37	35
Grau de Ramificação aparente (AX)	—	—	0,23	0,17	0,11	0,10

^a – percentagem molar obtida por soma de todos os resíduos do mesmo glúcido obtidos por análise de metilação; ^b – percentagem molar obtida pela análise dos açúcares neutros



Através dos resultados obtidos da análise de metilação identificou-se quais as fracções que contêm AX, permitindo assim determinar o rendimento da extracção destes polissacarídeos da dreche para a extracção sequencial A. O valor do rendimento de extracção foi quantificado pela razão estabelecida entre AX extraídas e AX na amostra inicial, em que a quantidade destes polissacarídeos foi calculada a partir da soma da quantidade de resíduos de Xyl e Ara provenientes das AX. Os dados da **Figura 9** permitiram estabelecer a comparação entre o rendimento de extracção das AX da dreche obtidas pela extracção sequencial A com os resultados publicados por Mandalari *et al.* (2005) (IFR) presentes nos diferentes extractos. Por observação da **Figura 9** verifica-se que as AX são maioritariamente extraídas com soluções de KOH. Para a extracção sequencial A, as concentrações de KOH 0,1; 0,5 e 1 M extraíram a mesma quantidade de AX (11-13% cada), enquanto com a solução de KOH a 4 M extraiu-se o dobro (26%). Pela quantidade de AX extraídas pela extracção sequencial A e pelo processo de extracção utilizado no estudo do IFR verificaram-se diferenças na extractibilidade destes polissacarídeos (**Figura 9**) pelas diferentes soluções de KOH. A solução que extrai a maior quantidade de AX no estudo IFR é a concentração de 0,5 M, enquanto que na extracção sequencial A verifica-se um melhor desempenho na extracção das AX quando se utiliza uma concentração de KOH de 4 M. Uma possível explicação para este resultado é o facto é o tamanho das partículas de dreche, dado que no estudo IFR houve uma moagem, processo esse que foi evitado neste estudo. Os tratamentos com água à temperatura ambiente ou água quente não se revelam eficientes na extracção das AX, tal como verificado por Mandalari *et al.* (2005). Estas soluções extraem 63% das AX da dreche, sendo 52% destas AX solúveis em água fria (**Figura 10**). No estudo do IFR eram extraídas 53% das AX. Não há referência quanto à sua solubilidade em água. A maior parte destas AX foram extraídas com a solução de KOH 0,5 M (36%) e 4 M (11%), não tendo sido obtida uma quantidade significativa de AX com 0,1 M (<1%) nem 1 M (4%).

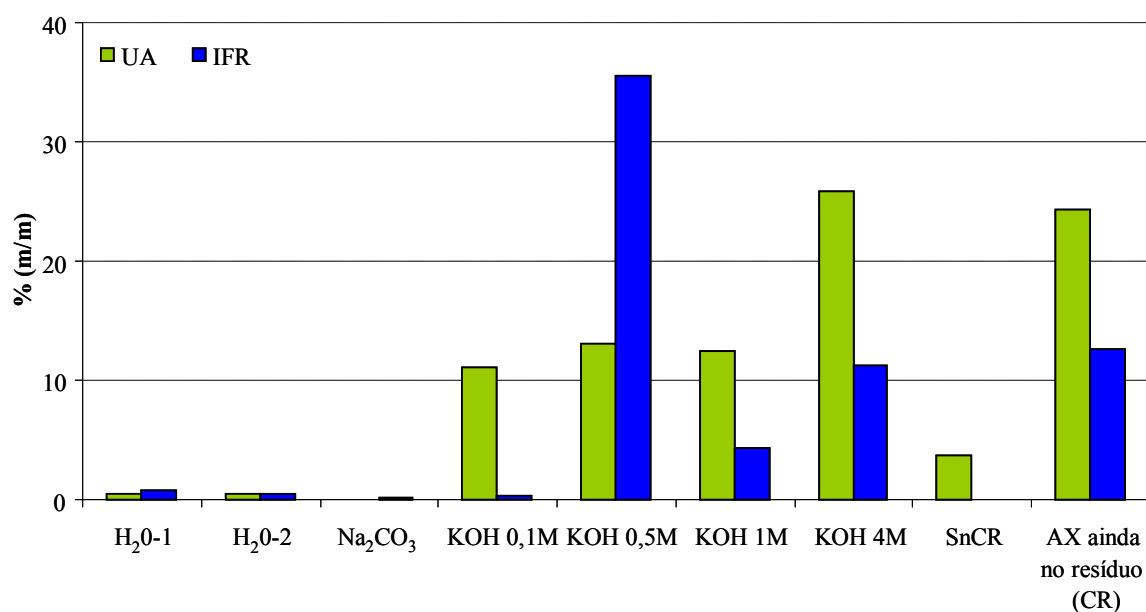


Figura 9: Comparação da extracção sequencial obtida pela UA e com a publicada pelo IFR na extractabilidade das AX.

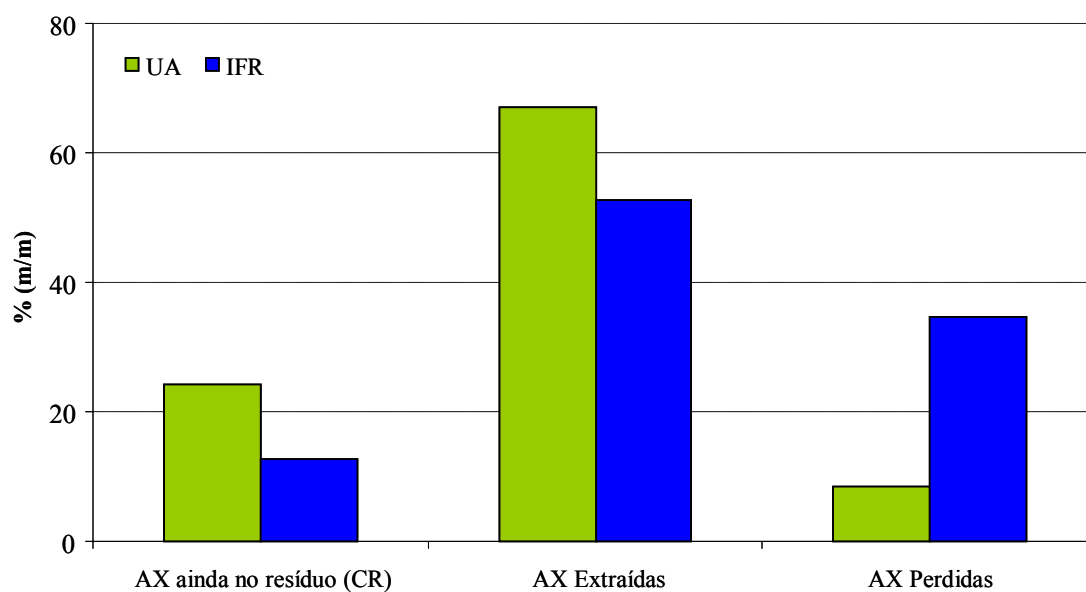


Figura 10: Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extracção e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção. Comparação entre os resultados da UA e os publicados pelo IFR.

Algumas das fracções obtidas pela extracção sequencial revelaram-se pobres em açúcares. Por exemplo, a fracção “Pp KOH 0,1M-A” tem somente 6% de açúcares; outras fracções, como aquelas resultantes dos precipitados de KOH também



apresentavam quantidades relativamente pequenas de açúcares (40 a 50 %). Como estas fracções poderão ser ricas em proteínas, dado que as proteínas da dreche são extraídas com soluções alcalinas (Celus *et al.*, 2007), foi feita uma análise de aminoácidos.

3.3 Análise do material proteico

O material proteico extraído nas 4 fracções de precipitado de KOH foi quantificado por determinação dos aminoácidos libertados após a hidrólise ácida e derivatizados com o anidrido heptafluorobutírico conforme o descrito no Capítulo II- Materiais & Métodos.

A designação Asx é a sigla utilizada para a quantificação simultânea da asparagina e do ácido aspártico e o mesmo acontece para a designação Glx que é utilizada para a quantificação da glutamina e do ácido glutâmico. Os aminoácidos glutamina (Gln) e asparagina (Asn) são muito lábeis ao pH ácido utilizado na hidrólise do material proteico, pelo que as suas amidas são convertidas nos respectivos ácidos, ácido glutâmico (Glu) e ácido aspártico (Asp), respectivamente.

3.3.1 Análise de aminoácidos

A **Tabela 10** apresenta a composição em aminoácidos libertados após a hidrólise ácida do material proteico no material de alto peso molecular (HMWM) existente nas fracções extraídas com soluções de KOH que precipitaram após a acidificação com o ácido acético glacial e com o teor de açúcares não superior a 40% que correspondem às fracções “Pp KOH 0,1M-A”; “Pp KOH 0,5M-A”; “Pp KOH 1M-A” e “Pp KOH 4M-A”. A percentagem de aminoácidos nestas fracções é de 34%, 14%, 15% e 10%, respectivamente. Os aminoácidos maioritários são Glx, Asx e leucina (Leu); enquanto alanina (Ala), glicina (Gly), valina (Val), treonina (Thr), serina (Ser), isoleucina (Ile), prolina (Pro), fenilalanina (Phe) e lisina (Lys) são os aminoácidos que se apresentam em menores quantidades. Estes resultados estão de acordo com Roberston *et al.* (2010), em que refere que os aminoácidos maioritários na dreche são Glx, Asx, Leu e Pro, o que significa que as fracções apresentam o mesmo perfil, excepto para a Pro.



Tabela 10: Composição em aminoácidos (g de material / 100 g de fracção) das fracções extraídas com soluções de KOH e com o teor de açúcares não superior a 41,6% (g / 100g)

Aminoácidos	Fracção (g/100 g)			
	Pp KOH 0,1M	Pp KOH 0,5M	Pp KOH 1M	Pp KOH 4M
Ala	1,07 ± 0,21	0,66 ± 0,16	0,49 ± 0,01	0,35 ± 0,02
Gly	0,64 ± 0,02	0,29 ± 0,03	0,22 ± 0,002	0,10 ± 0,00
Val	1,72 ± 0,15	0,86 ± 0,37	0,83 ± 0,04	0,52 ± 0,01
Thr	0,73 ± 0,04	0,28 ± 0,06	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,00
Ser	0,71 ± 0,00	0,40 ± 0,07	0,37 ± 0,01	0,23 ± 0,00
Leu	5,09 ± 0,06	2,83 ± 0,02	2,83 ± 0,19	2,38 ± 0,04
Ile	2,06 ± 0,03	0,91 ± 0,42	1,11 ± 0,04	0,76 ± 0,01
Pro	2,70 ± 0,01	0,92 ± 0,10	0,92 ± 0,07	0,53 ± 0,00
Asx	3,78 ± 0,54	1,60 ± 0,02	1,63 ± 0,07	1,23 ± 0,01
Phe	1,41 ± 0,04	0,60 ± 0,07	0,56 ± 0,04	0,43 ± 0,00
Glx	12,84 ± 0,93	4,31 ± 0,38	4,97 ± 0,39	3,22 ± 0,04
Lys	1,30 ± 0,29	0,42 ± 0,05	0,58 ± 0,05	0,43 ± 0,01
Total	34,05 ± 1,38	14,09 ± 0,51	14,76 ± 0,90	10,34 ± 0,17

- ^a média ± desvio padrão

Pela **Figura 11** verifica-se que a composição de aminoácidos do material proteico do material de alto peso molecular extraído para todas as fracções de “Pp KOH-A” são análogas entre si.

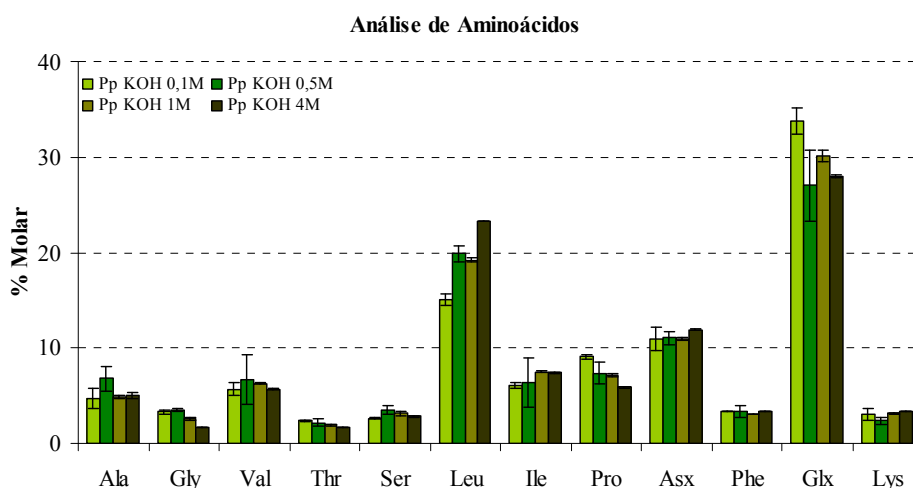


Figura 11: Composição molar em aminoácidos das fracções precipitadas após neutralização dos extractos alcalinos.



3.4. Optimização da extracção sequencial das AX tendo em vista a sua aplicação industrial

3.4.1. Extracção sequencial B

Para o isolamento das AX tendo em atenção a sua aplicação industrial, recorreu-se à extracção sequencial apenas com soluções de KOH e somente duas concentrações (0,5 e 4 M), tal como descrito na **Figura 12** (extracção sequencial B).

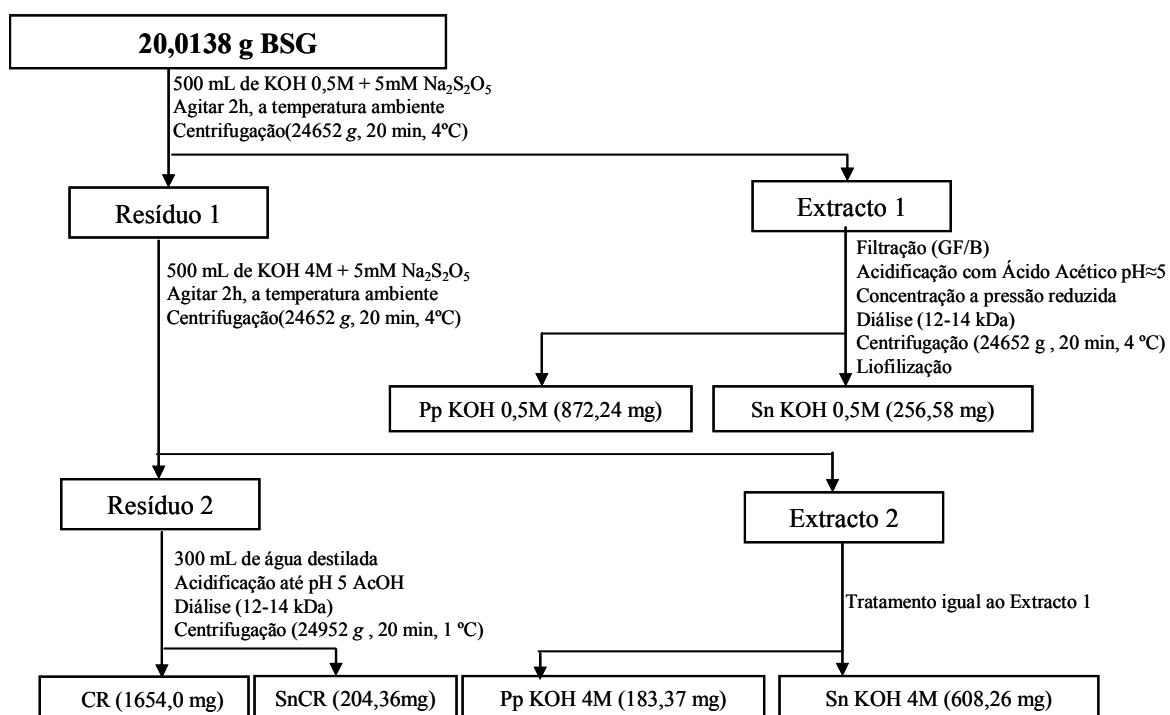


Figura 12: Fluxograma da extracção sequencial das AX da dreche (BSG) somente com soluções de KOH de concentração crescente 0,5 e 4 M (extracção sequencial B).

De acordo com a **Figura 12**, a solução de KOH 0,5 M solubilizou 24,3% do material inicial e a solução de KOH 4 M solubilizou 26,4%. Comparando com a extracção sequencial A, verifica-se que há um aumento de 4,2% na quantidade de material extraído pela solução de KOH 0,5 M quando comparado com a extracção anterior com água+KOH 0,1 M+KOH 0,5 M. Há também um aumento de 8,9% na quantidade de material extraído pela solução de KOH 4 M quando comparado com a extracção anterior com KOH 1 M+KOH 4 M. A quantidade de material polimérico presente no resíduo celulósico “CR-B” correspondeu a 34 % da massa de dreche-B inicial, tendo sido ainda solubilizado 4% do material inicial durante a diálise (“SnCR-



B”). A massa de “CR-B” é maior em 12% à obtida para o “CR-A”. Para se averiguar se houve alterações ao nível da extracção de AX, foi feita a análise de açúcares a todas as fracções e resíduo obtidos (**Tabela 11**).

A análise de açúcares efectuada às diferentes fracções (**Tabela 11**) mostra que as AX são predominantes nas fracções solúveis (“Sn KOH-B”), mais ricas em Xyl, enquanto as glucanas não celulósicas predominam nas fracções insolúveis, mais ricas em Glc. A composição de açúcares neutros no “CR-B” mostra como açúcares principais a Glc (66 %, molar), Xyl (24 %, molar) e Ara (17 %, molar). As glucanas não celulósicas representam 7% da massa do resíduo, enquanto a celulose representa 34% e as AX 25%.

Atendendo à quantidade de xilose e arabinose obtidas, pode-se estimar a quantidade de AX extraída em 52% das AX presentes na dreche, um valor que é inferior ao obtido na extracção A (64%). Como a quantidade de AX no resíduo da extracção B também é inferior ao da extracção A (**Figura 13**), pode-se inferir que na extracção B houve uma maior perda de AX do que na extracção A. Atendendo a que o lote de dreche é diferente, estes resultados podem ser devidos à variabilidade da dreche. No entanto, é de esperar que a extracção de AX seja sempre menor na extracção B do que na A, tal como verificado.

Tabela 11: Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares^a do material polimérico da dreche das fracções obtidas pela extracção sequencial com soluções de KOH de concentração crescente, 0,5 e 4 M, designado por extracção sequencial B.

Fracção		Rend ^b (%)	Açúcares existentes na dreche (% molar)								Açúc.-Totais (g /100 g)
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc (NC)	Glc (C)	
Dreche-B		—	0,33 ^{a,c}	0,14	21,41	35,50	1,46	3,12	17,51	20,53	52,2
KOH (0,5M)	Sn-B	5,30	0,12	0,05	32,79	53,36	0,43	2,43	10,83	0,00	78,9
	Pp-B	18,01	0,42	0,21	9,18	23,88	1,07	2,33	62,91	0,00	19,4
KOH (4M)	Sn-B	12,56	0,16	0,07	28,40	57,14	1,13	3,55	9,53	0,00	79,3
	Pp-B	3,79	0,17	0,02	7,71	45,28	0,26	0,66	45,90	0,00	73,0
Resíduo Final	SnCR-B	4,22	0,00	0,00	36,41	47,81	0,48	4,92	10,38	0,00	41,2
	CR-B	34,15	0,15	0,05	16,81	24,20	1,18	2,11	20,63	34,86	68,6

- ^aValores expressos em anidroaçúcares; ^bPercentagem de material extraído em cada fracção, relativamente à massa seca de dreche; ^c média

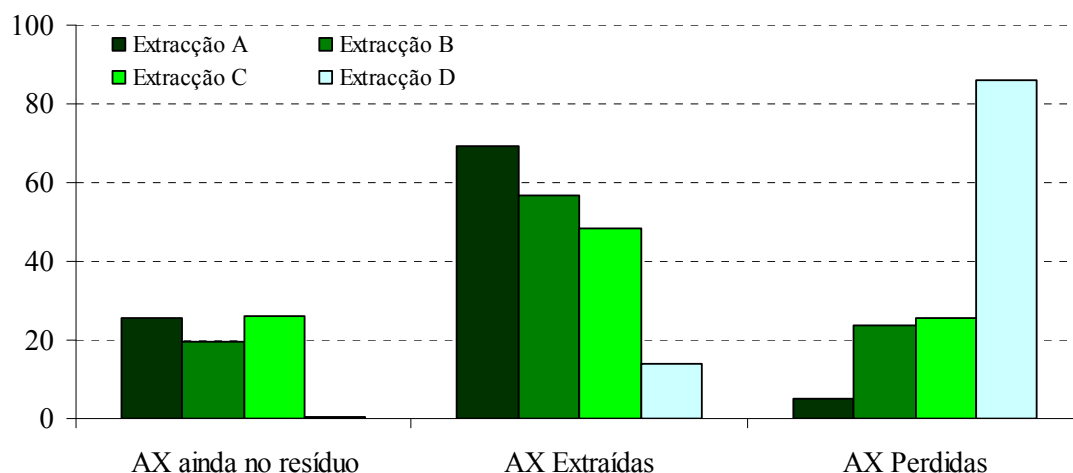


Figura 13: Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extracção e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção, para as extracções sequenciais A, B, C e D.

3.4.2. Extracção sequencial C

Atendendo a que a extracção sequencial B extraiu muito material não polissacarídico, numa tentativa de purificar os extractos e, simultaneamente, aumentar a extractabilidade das AX, recorreu-se a um pré-tratamento da dreche com etanol, permitindo a obtenção de um resíduo insolúvel em álcool (AIR) a partir do qual se fez a extracção sequencial designada por “C” (**Figura 14**). Este tratamento poderá ter a vantagem de eliminar compostos de baixa massa molecular e evitar que estes tipos de compostos interfiram com a extracção das AX.

A solução de KOH 0,5 M solubilizou 21,2% do material inicial e a solução de KOH 4 M solubilizou 14,8%. Comparando com a extracção sequencial B, verifica-se que há uma diminuição de 6,4% na quantidade de material extraído pela solução de KOH 0,5 M quando comparado com a extracção anterior. Há também uma diminuição de 11,6% na quantidade de material extraído pela solução de KOH 4 M quando comparado com a extracção anterior. A quantidade de material polimérico presente no resíduo celulósico “CR-C” correspondeu a 29% da massa de dreche-C inicial, tendo sido ainda solubilizado 3% do material inicial durante a diálise (“SnCR-C”). A massa de “CR-C” é 5% menor do que a obtida para o “CR-B”. Estes resultados mostram que a quantidade de massa extraída nos dois extractos e a massa que permaneceu no resíduo



foi sempre menor. Para se averiguar se esta diminuição de massa está associada à diminuição de AX ou simplesmente à diminuição de material não glucídico, foi feita a análise de açúcares a todas as frações e resíduo obtidos (**Tabela 12**).

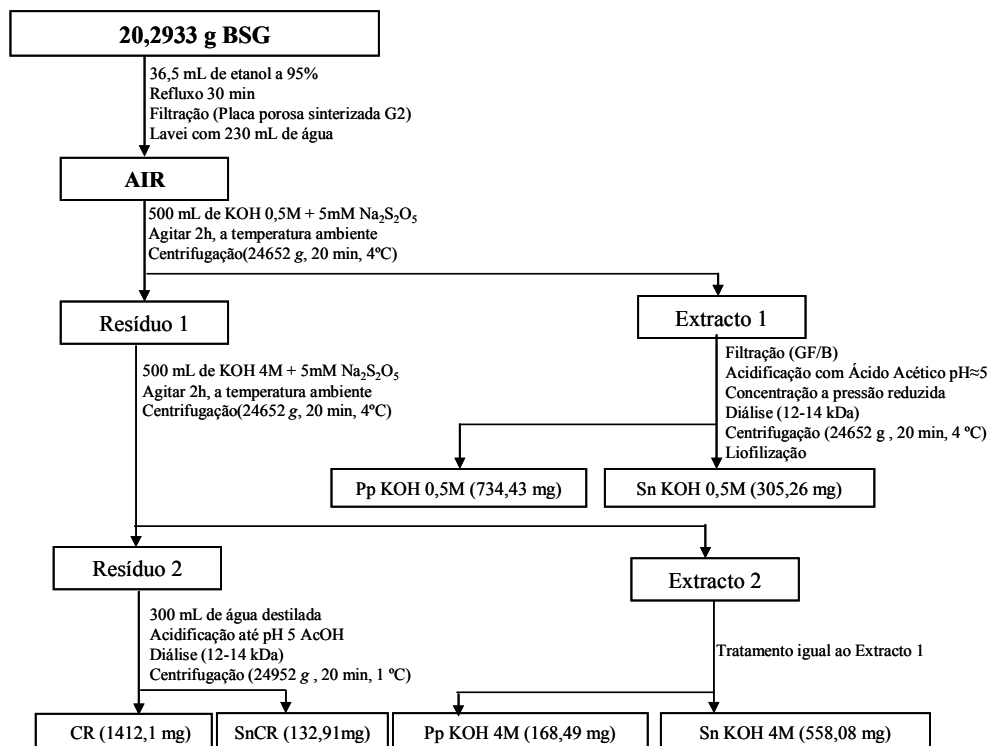


Figura 14: Fluxograma da extração sequencial das AX a partir do AIR da dreche (BSG) somente com soluções de KOH de concentração crescente 0,5 e 4 M (extração sequencial C).

Tal como verificado para a extração B, as frações solúveis (“Sn KOH-C”) são mais ricas em Xyl, predominando as AX, enquanto as glucanas não celulósicas predominam nas frações insolúveis, mais ricas Glc. A composição de açúcares neutros no “CR-C” é semelhante aos CR anteriores, tendo como açúcares principais a Glc (68 %, molar), Xyl (24 %, molar) e Ara (15 %, molar). As glucanas não celulósicas representam 7% da massa do resíduo, enquanto a celulose representa 43% e as AX 28%. Atendendo à quantidade de xilose e arabinose, podemos estimar a quantidade de AX extraída em 45% das AX presentes na dreche, um valor que é inferior ao obtido quer na extração A, quer na B (64 e 52%, respectivamente). Como a quantidade de AX no resíduo da extração C é superior ao da extração B (**Figura 13**), pode-se inferir que o pré-tratamento com etanol diminui a quantidade de AX extraídas.



Tabela 12: *Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares^a do material polimérico do AIR da dreche e das fracções obtidas pela extracção sequencial C.*

Fracção		Rend ^b (%)	Açúcares existentes na dreche (% molar)								Açúc. Totais (g/ 100 g)
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc (NC)	Glc (C)	
AIR		—	0,29 ^{a,c}	0,09	22,71	37,17	1,43	2,90	17,51	20,53	55,4
AL_AIR		0,96	0,49	0,08	8,01	8,07	1,39	4,57	77,41	0,00	35,4
KOH (0,5 M)	Sn-C	6,22	0,11	0,06	32,95	53,73	0,42	2,41	10,33	0,00	78,3
	Pp-C	15,0	0,00	0,00	12,25	28,93	1,06	2,73	55,03	0,00	21,6
KOH (4 M)	Sn-C	11,4	0,14	0,08	25,83	58,93	1,29	3,48	10,26	0,00	79,4
	Pp-C	3,43	0,00	0,00	6,24	38,03	0,26	0,51	54,96	0,00	71,1
Resíduo pH≈ 5	SnCR-C	2,71	0,36	0,15	39,89	46,34	0,39	5,47	7,40	0,00	43,7
	CR-C	28,8	0,17	0,03	14,81	24,35	0,73	1,87	17,81	40,24	79,6

- ^aValores expressos em anidroaçúcares; ^bPercentagem de material extraído em cada fracção, relativamente a massa seca de dreche; ^c média

3.4.3. Extracção sequencial D

A extracção sequencial D consistiu na preparação do AIR da dreche seguida de deslenhificação por oxidação da lenhina com hipoclorito de sódio em meio ácido de modo a permitir a abertura da estrutura lenho-celulósica, com o objectivo de aumentar a extractabilidade das AX. O AIR deslenhificado foi sujeito à extracção sequencial com soluções de KOH de 0,5 e 4 M, tal como descrito na **Figura 15** (extracção sequencial D).

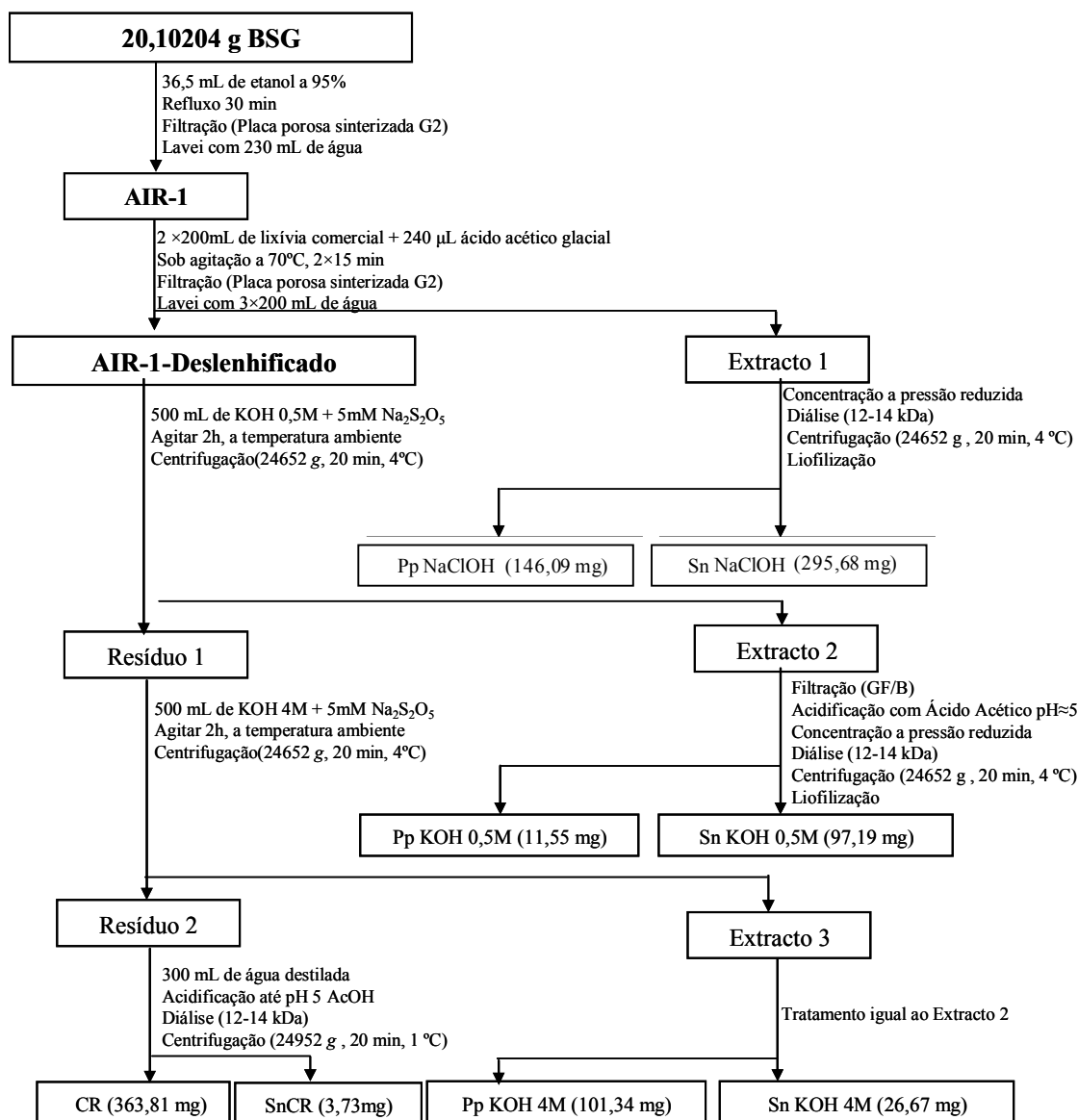


Figura 15: Fluxograma da extracção sequencial das AX a partir do AIR deslenhificado da dreche (BSG) com soluções de KOH de 0,5 e 4 M (extracção sequencial D)

De acordo com a **Figura 15**, a solução de KOH 0,5 M solubilizou somente 2% do material inicial e a solução de KOH 4 M solubilizou somente 3%. A quantidade de material polimérico presente no resíduo celulósico “CR-D” correspondeu a 7% da massa de dreche-D inicial. Enquanto que a composição em açúcares dos extractos de KOH foram muito semelhantes aos obtidos nas extracções sequenciais feitas anteriormente, a composição em açúcares do “CR-D” mostrou ser este muito rico em Glc e a arabinose e a xilose só foram encontradas em quantidades muito pequenas



(0,5% e 1%, respectivamente). As análises às fracções solubilizadas com hipoclorito mostraram a presença de arabinose e xilose em quantidades elevadas. Estes resultados permitem concluir que o pré-tratamento com o hipoclorito solubilizou a maior parte das AX, que se perderam, possivelmente por difusão pela membrana de diálise na forma de oligossacarídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Coimbra *et al.* (1995) por deslenhificação dos tecidos do caroço da azeitona.

Tabela 13: Rendimento em massa extraída e composição em percentagem molar de açúcares^a do material polimérico do AIR deslenhificado da dreche das fracções obtidas pela extracção sequencial D.

Fracção		Rend ^b (%)	Açúcares existentes na dreche (% molar)							Açúc. Totais (g/100 g)	
			Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc (NC)		Glc (C)
AIR			0,30 ^{a,c}	0,12	25,22	35,85	1,58	3,35	13,82	19,77	55,0
AL_AIR		2,00	0,52	0,10	6,56	6,58	1,82	5,62	78,81	0,00	28,7
NaClOH	Sn-D	6,07	0,46	0,12	22,53	54,72	0,62	2,89	18,65	0,00	56,9
	Pp-D	3,00	0,44	0,06	6,37	11,55	1,33	1,50	78,74	0,00	19,7
KOH (0,5M)	Sn-D	2,00	0,12	0,03	14,03	69,17	0,52	1,71	14,42	0,00	78,0
	Pp-D	0,24	0,09	0,04	8,45	48,65	2,55	1,62	38,60	0,00	29,0
KOH (4M)	Sn-D	0,55	0,16	0,04	9,74	61,23	1,28	1,38	26,17	0,00	68,8
	Pp-D	2,08	0,00	0,00	0,00	3,18	0,00	0,00	96,82	0,00	51,4
Resíduo pH≈ 5	SnCR-D	0,08	0,65	0,27	28,28	37,50	5,42	8,69	19,21	0,00	20,3
	CR-D	7,47	0,00	0,16	0,86	1,78	1,03	0,19	74,33	21,65	6,1

- ^aValores expressos em anidroaçúcares; ^bPercentagem de material extraído em cada fracção, relativamente à massa seca de dreche; ^cmédia

Pelas extracções sequenciais realizadas, pode-se concluir que a extracção da dreche com KOH 0,5 M e 4 M permite extrair uma quantidade de AX relativamente menor do que aquela que se consegue extrair com a extracção sequencial completa (extracção sequencial A). Os pré-tratamentos com etanol e de deslenhificação usados não permitem melhorar a eficiência de extracção. No entanto, dadas as características das AX extraídas com 0,1 M, com maior grau de ramificação, e por isso, mais solúveis em água, esta solução de KOH será considerada no processo de extracção.



3.4.4. Efeito do aumento do tempo de extracção na quantidade de AX extraídas

Os estudos anteriores demonstraram quais as soluções de 0,1; 0,5 e 4 M de KOH são as mais eficazes no processo de extracção da AX.

Para avaliar se o aumento do tempo de contacto entre os reagentes alcalinos e a dreche poderia aumentar a quantidade de AX extraídas, foi feita uma extracção sequencial com soluções de KOH 0,1 M, 0,5 M e 4 M de 24 horas cada. A **Figura 16** mostra que se consegue extrair 74%, tendo permanecido no resíduo 14%. Pela diferença, pode-se estimar que, com este procedimento, foram perdidas 13% de AX.

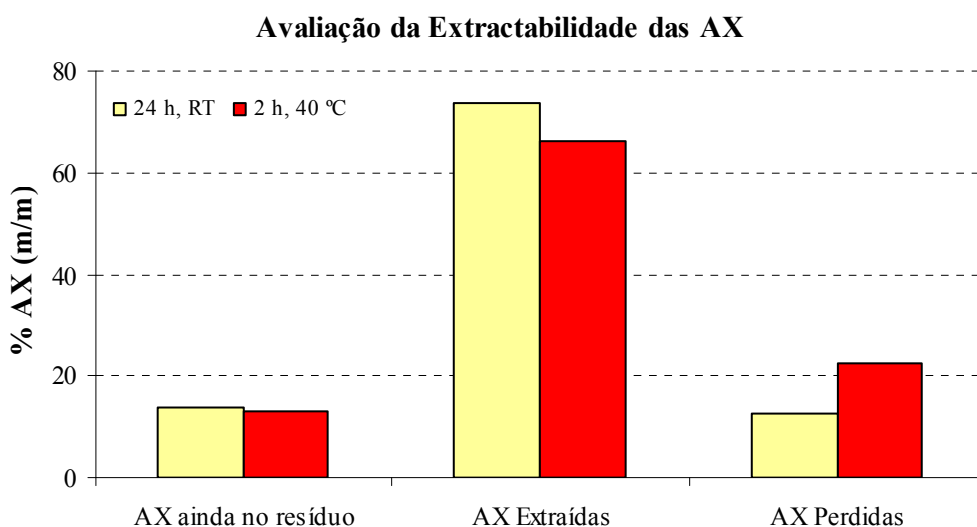


Figura 16: Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extracção e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extracção, nas diferentes condições de temperatura e do tempo extracção.

Numa tentativa de reduzir o tempo de extracção, foi ainda feita uma experiência em que a dreche foi extraída com as soluções alcalinas à temperatura de 40°C durante 2 horas. A **Figura 16** mostra que, nestas condições, foi possível extrair 66% das AX, ficando ainda 14% no resíduo. A perda foi de 20%. Estes resultados permitem concluir



que a extracção à temperatura ambiente durante 24 horas permite a melhor extracção das AX.

3.4.5. Efeito da diminuição do volume de reagente alcalino na quantidade de AX extraídas

Nesta fase do trabalho já foram definidos usados os seguintes parâmetros de extracção para as AX, nomeadamente as concentrações de KOH a utilizar (0,1; 0,5 e 4 M), a temperatura de extracção (temperatura ambiente) e o tempo de extracção (24 h), faltando apenas realizar a avaliação do efeito da redução do volume do reagente alcalino.

Para a optimização deste parâmetro optou-se por realizar um processo que pudesse mimetizar um futuro processo industrial. Assim os extractos alcalinos foram neutralizados com uma solução saturada de ácido cítrico, dado este ácido ser utilizado na indústria alimentar. A recuperação das AX foi realizada através da precipitação em etanol evitando assim o recurso à diálise, diminuindo o tempo de obtenção destes polissacarídeos. Os fluxogramas da **Figura 17** e da **Figura 18** esquematizam o processo para a extracção das AX da dreche para os diferentes rácios utilizados.

A **Figura 17** mostra os resultados obtidos para o rácio de dreche/KOH 1:5, em que a quantidade de AX é expressa em relação a uma tonelada de dreche. De acordo com estes resultados, podem ser extraídas 73% das AX totais da dreche. Do total de AX extraídas por este processo, 63%, que corresponde a 42 kg de AX dos 66 kg iniciais presentes numa tonelada são solúveis em água, permanecendo as restantes 10% na fracção proteica que correspondem a 7 kg de AX das 66 kg iniciais.

A **Figura 18** mostra os resultados obtidos para o rácio dreche/KOH 1:2, indicando que podem ser extraídas 66% das AX totais da dreche cervejeira. Do total de AX extraídas por este processo, 59%, que corresponde a 40 kg de AX das 68 kg iniciais, são solúveis em água, permanecendo as restantes 7% na fracção proteica que correspondem a 4,6 kg de AX das 68 kg iniciais.

Pelas **Figuras 19** e **20**, que sistematizam os rendimentos de extracção das AX para os dois rácios, verifica-se que a redução para quase 1/3 do volume de KOH afecta relativamente pouco a quantidade de AX extraídas da dreche, sendo de ponderar esta redução de reagente numa utilização industrial.

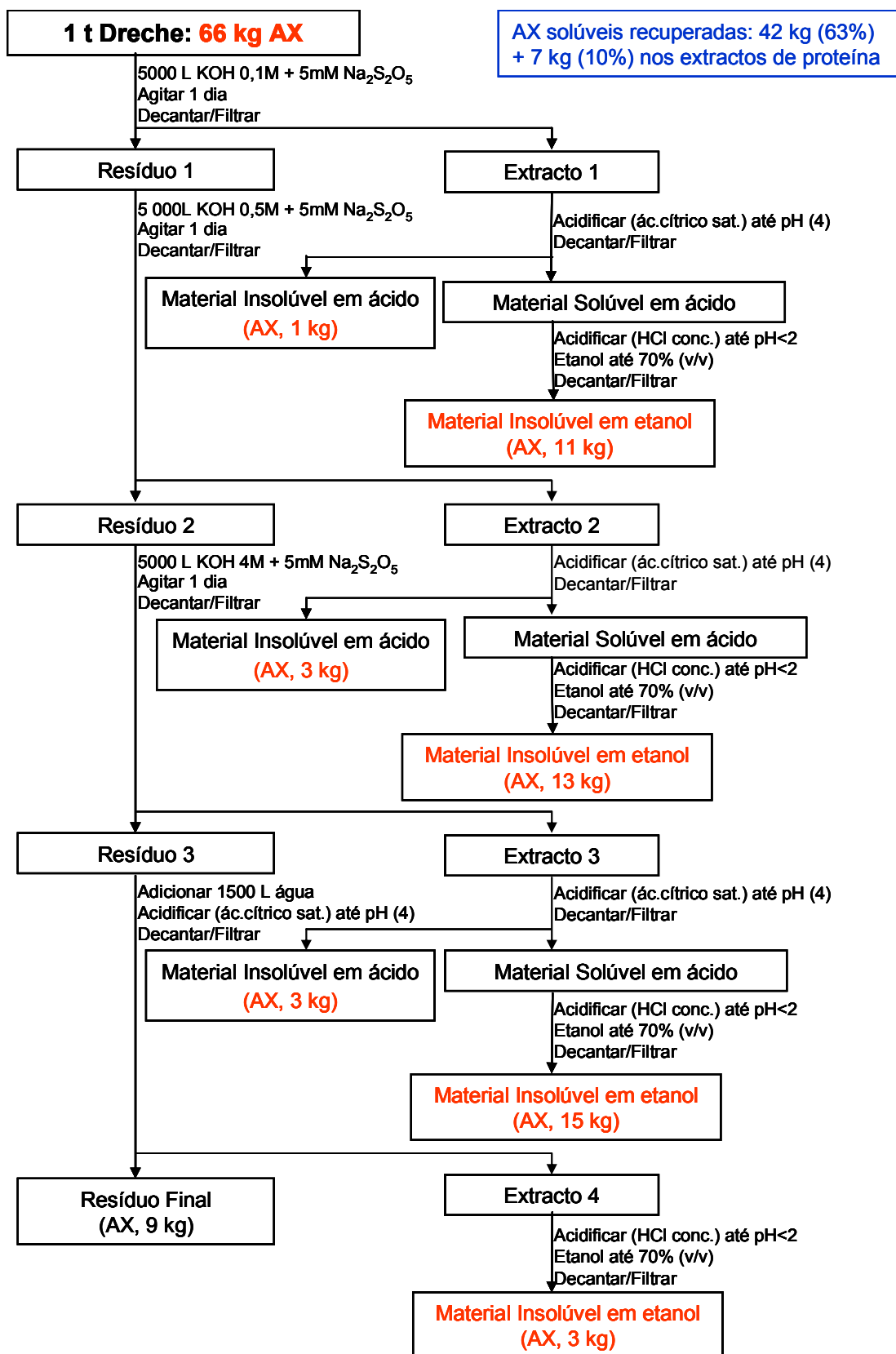


Figura 17: Extração sequencial das AX da dreche com soluções de KOH com concentrações crescentes para o rácio de dreche/KOH 1:5.

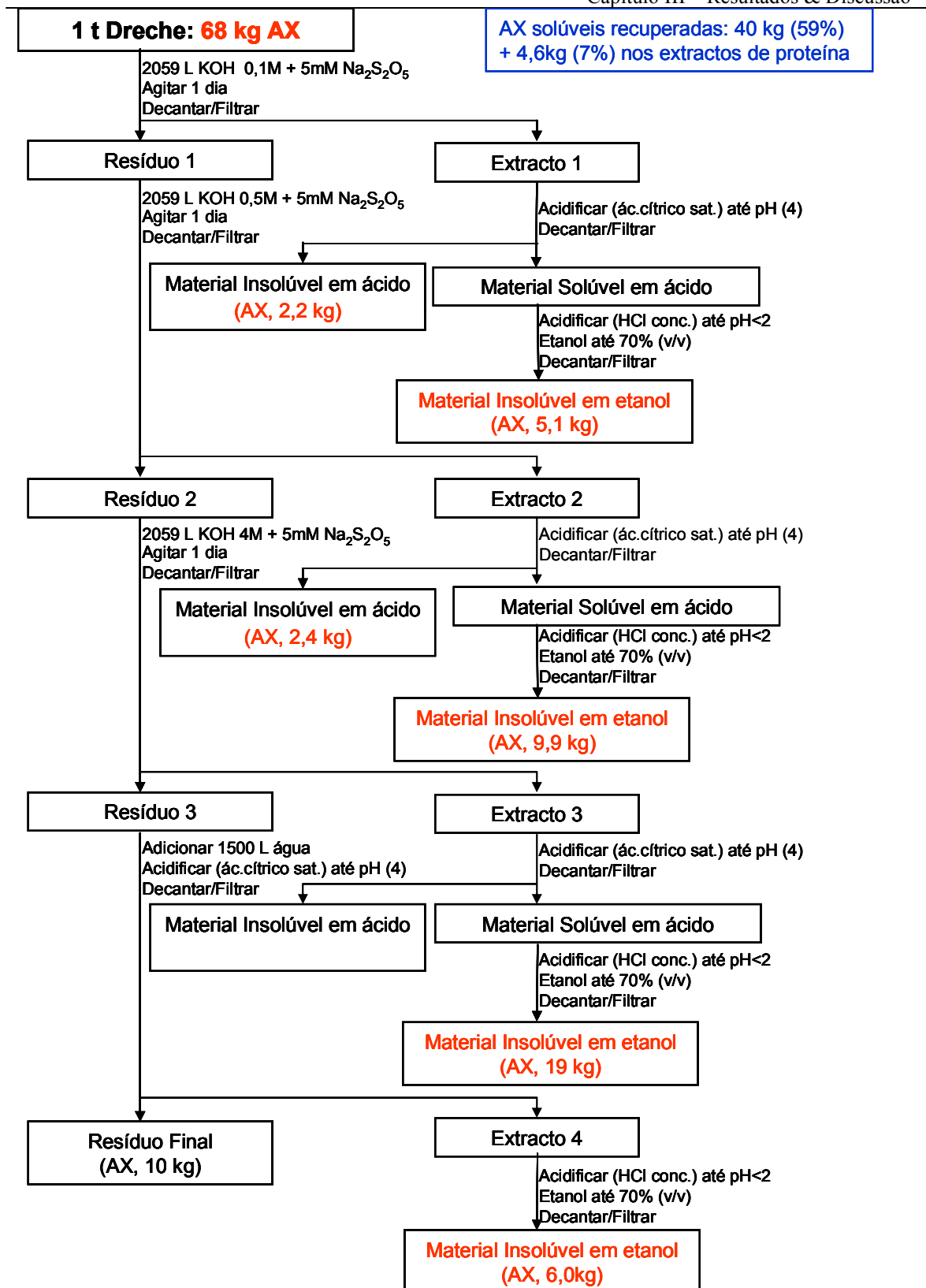


Figura 18: Extração sequencial das AX da dreche com soluções de KOH com concentrações crescentes para o rácio de dreche/KOH 1:2.

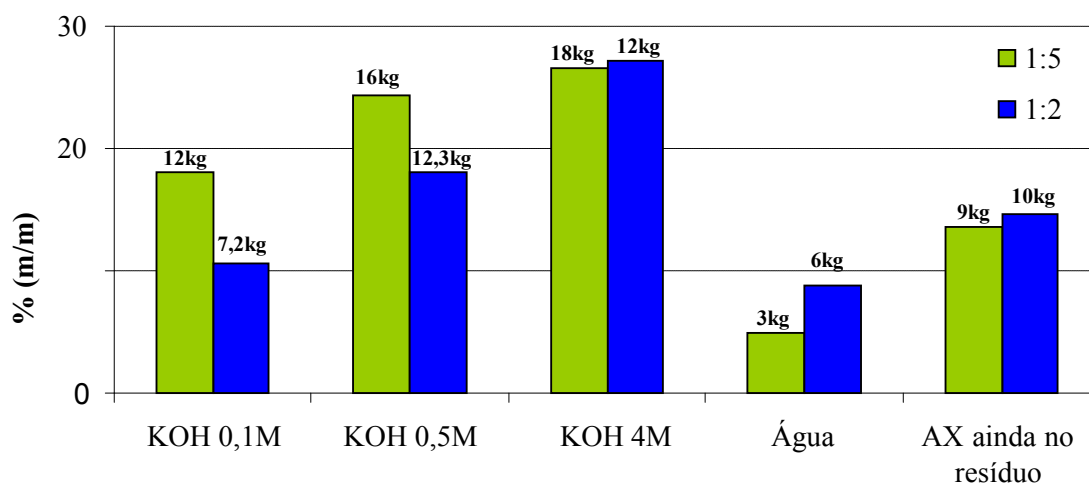


Figura 19: Comparação da extração sequencial com soluções crescentes de KOH obtida pela extractabilidade das AX para os rácios de dreche/KOH 1:5 e 1:2. Os valores apresentados nas barras correspondem à massa de AX extraída por tonelada de dreche.

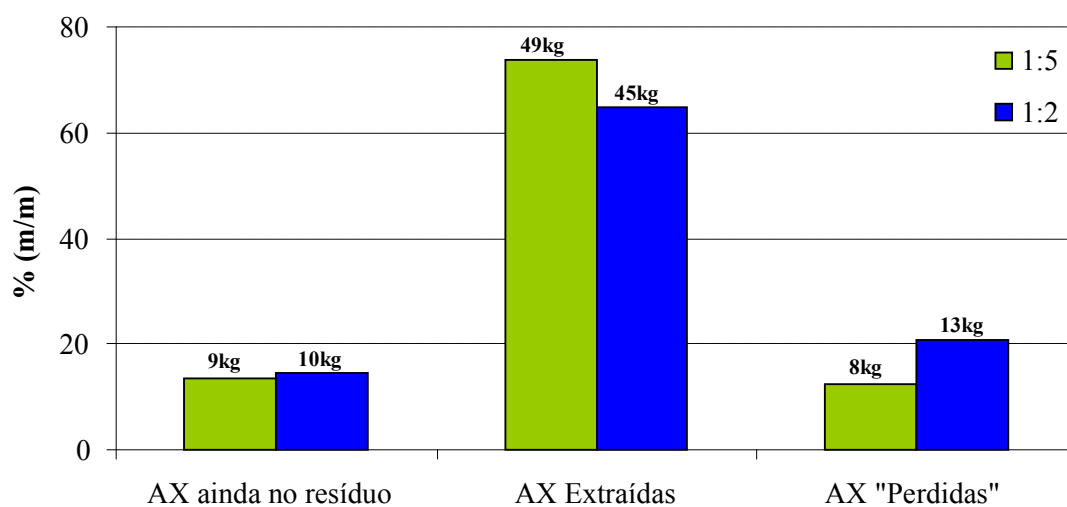


Figura 20: Quantidade de AX extraídas, AX perdidas durante o processo de extração e AX que ainda permaneceram no resíduo após a extração. Os valores apresentados nas barras correspondem à massa de AX extraída por tonelada de dreche.



3.5. Extracção das AX por tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas

Para a extracção das AX recorreu-se ao tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas. Este tratamento consiste na combinação da água com temperatura. O aumento de temperatura é conseguido através da irradiação por micro-ondas, em que as moléculas de água não são ionizadas, no entanto, estas oscilam em torno do seu eixo, ao tentar alinhar-se com o campo eléctrico oscilante gerado pelas micro-ondas, produzem uma fricção molecular, o que provoca aquecimento (Eskilsson & Bjöklund, 2000). O processo de extracção das AX ocorre em sistema fechado; quando se inicia o processo de vaporização da água faz com que haja um aumento da pressão. Com o tratamento hidrotérmico da dreche obteve-se um extracto aquoso e um resíduo. Este resíduo atribui-se a designação de resíduo celulósico (“CR”). Ao extracto adicionou-se etanol até ocorrer a precipitação com o objectivo de recuperar as AX extraídas. O precipitado designou-se por “ET70” e o sobrenadante do etanol por “ETSn”.

3.5.1. Medição do pH antes e depois das experiências do micro-ondas

Em cada experiência procedeu-se à medição do pH nos diferentes extractos, esta medição efectuou-se antes e depois do tratamento hidrotérmico da dreche. Na **Figura 21** apresenta os resultados obtidos na medição pH nos diferentes tratamentos hidrotérmicos. O pH dos diferentes extractos é semelhante antes de se iniciar o tratamento, cujo valor é de 6,0. A partir dos dados expressos, podemos concluir que o pH vai descendo à medida que aumenta a temperatura aplicada nos diferentes tratamentos hidrotérmicos. No que diz respeito à variação de pH, este aumenta à medida que aumenta a temperatura. A maior variação registada acontece na experiência com a temperatura de 210°C e a menor variação na de 140 °C. A diminuição do pH é passível de ser explicada através do aumento da temperatura, na medida em que esta faz com que ocorra a libertação de grupos ácidos existentes na matriz (dreche), contribuindo para a redução do pH da água no decurso do tratamento hidrotérmico (Mosier *et al.*, 2005). Estes resultados estão de acordo com a bibliografia (Roos *et al.*, 2009 e Rose & Inglett, 2010) em que as AX são extraídas das cascas da cevada e do farelo de milho por tratamento hidrotérmico assistido por MW, respectivamente.

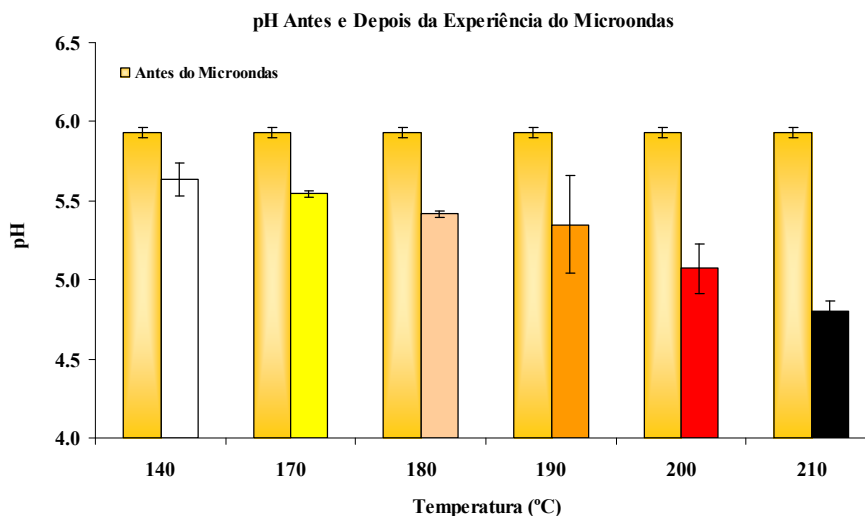


Figura 21: Representação gráfica da medição de pH nas diferentes experiências de temperaturas (140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C) utilizadas no tratamento com MW. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada ensaio de temperatura.

3.5.2. Análise de açúcares neutros e análise de metilação das fracções obtidas por micro-ondas

Na **Tabela 14** estão apresentados os resultados obtidos para o rendimento em massa e da análise de açúcares dos resíduos celulósicos (“CRs”) e das fracções obtidas para as diferentes temperaturas aplicadas no tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas. Atendendo, aos resultados obtidos, constatou-se que os extractos que apresentaram maiores quantidades da massa solubilizada foram aqueles que resultaram do tratamento hidrotérmico sujeitos às temperaturas de 210 °C (30,4%), de 200 °C (27,2%) e de 190 °C (23,1%).

A análise de açúcares neutros mostra que as fracções “ET70” são ricas em açúcares totais numa gama compreendida entre 55 a 84% quando comparadas com as fracções “ETS_n” (entre 35 a 43%). Em todas as fracções (“ET70” e “ETS_n”) e “CR” predominam a Ara, Xyl e Glc e também, quantidades vestigiais de Gal e Man. Estas fracções apresentam diferenças na sua composição no que diz respeito aos açúcares. As fracções “ET70” que foram obtidas a uma temperatura de 140 °C e os “CRs” às temperaturas de 180, 190, 200 e 210 °C, a Glc é o açúcar que mais se evidencia,



seguindo Xyl e, por último, Ara. Excepcionalmente, nas fracções do sobrenadante do etanol “ETS_n” obtidas a uma temperatura 140 e 170 °C assiste-se a uma inversão no predomínio de Ara e Xyl, no entanto, a Glc continua a ocupar um lugar destaque. A fracção “ET70” resultante do tratamento hidrotérmico à temperatura de 170 °C e os CRs à temperatura 140 e 170°C curiosamente, nestas fracções o açúcar que se destaca é a Xyl, só depois aparece a Glc e, por fim, a Ara. Para as fracções “ETS_n” à temperatura de 200 e 210 °C o açúcar que aparece em maiores quantidades é a Xyl, seguido Ara e Glc. Por fim, nas fracções “ETS_n” à temperatura de 180 e 190°C o açúcar que se evidencia é a Ara, sucedendo-se a Glc e a Xyl que trocam de posição quando a temperatura passa de 180 para 190 °C. Tendo por base os resultados obtidos na caracterização da composição em açúcares destas fracções pode-se afirmar a existência de AX, devido às elevadas quantidades de Ara e Xyl.

Tabela 14: *Rendimento e composição em açúcares das fracções obtidas nas diferentes temperaturas utilizando a irradiação do MW. Os valores apresentados são médias de quadruplicados para cada ensaio de temperatura.*

T (°C)	Fracção	Açúcares (% molar)						Açúc. Totais (g/100 g)
		Rend (%)	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	
140	ET70	1,0	9,1	9,4	0,9	2,4	77,4	54,9
	ETS _n	1,0	9,5	4,8	1,8	1,3	81,5	42,9
	CR	98,1	22,	37,6	1,2	2,9	36,0	40,4
170	ET70	4,0	21,4	34,5	0,8	3,2	39,7	67,4
	ETS _n	4,5	32,3	15,6	1,6	3,0	46,2	40,6
	CR	93,6	20,0	37,9	1,2	2,9	37,7	41,7
180	ET70	6,2	21,4	38,8	0,7	3,5	35,2	70,7
	ETS _n	6,1	41,4	23,9	1,5	3,7	28,0	34,8
	CR	87,8	17,4	38,7	1,3	2,3	40,2	41,4
190	ET70	10,1	21,7	43,0	0,6	3,3	31,1	75,2
	ETS _n	13,0	41,6	31,9	1,2	3,8	20,5	40,0
	CR	72,0	14,9	35,0	1,6	2,9	45,4	39,2
200	ET70	9,7	17,2	45,3	0,6	3,4	33,3	76,9
	ETS _n	17,5	37,9	40,0	1,2	3,9	16,0	43,2
	CR	61,3	9,3	33,7	1,7	2,1	52,9	40,2
210	ET70	8,2	13,6	47,4	0,7	3,2	34,8	83,8
	ETS _n	22,2	30,4	47,1	1,1	3,8	16,8	43,9
	CR	60,4	8,8	27,5	2,0	2,5	58,9	34,0



No processo de caracterização das fracções em termos de açúcares neutros surgiram indícios da presença dos seguintes polissacarídeos: celulose, glucanas não celulósicas e AX. No sentido de confirmar a existência ou não dos polissacarídeos atrás mencionados, efectuou-se a uma análise de metilação. Esta metodologia possibilitou a identificação e caracterização das ligações glicosídicas dos polissacarídeos extraídos. Em todas as fracções, salvo excepção da fracção “CR” foram metiladas. Os resultados estão expressos nas **Tabelas 15 e 16** e correspondem às fracções “ET70” e “ETSn”, respectivamente.

As fracções “ET70” evidenciam a presença de AX pela detecção de resíduos de Xyl em ligação (1→4), e as ramificações das AX são evidenciadas pelas ligações glicosídicas (1→2,4)-Xylp; (1→3,4)-Xylp e o xilitol ((1→2,3,4)-Xylp) sendo estas as ligações características das AX descritas na literatura (literatura (Revanappa *et al.*, 2010; Rao & Muralikrishna, 2004; Han, 2000).

Comparando as características estruturais das AX extraídas por tratamento hidrotérmico, verifica-se que o grau de ramificação de AX nas fracções “ET70” diminui à medida que aumentamos a temperatura do MW a partir dos 180°C; o que significa que AX perdem os substituintes, provavelmente por hidrólise. Os valores obtidos para o grau de ramificação são de 0,11 a 0,24.

O resultado da análise de metilação da fracção “ETSn” à temperatura de 140°C revela uma composição em ligações glicosídicas que se diferencia das anteriores, principalmente, pelo conteúdo mais elevado de resíduos de Glcp em ligação (1→4) e (1→3) e por um conteúdo vestigial de Xylp em ligação (1→4) e (1→3,4). Atendendo à quantidade de resíduos de Glc em ligação terminal e resíduos de Glc em ligação 1→4, podemos inferir a presença de dissacarídeos. A composição em ligações glicosídicas das restantes fracções “ETSn” obtidas apresentam as ligações características das AX, com resíduos de Xyl em ligação (1→4) (10,8 a 52,3% molar) e em posição terminal (1,2 a 3,8% molar) e as ramificações das AX são evidenciadas pelas ligações glicosídicas (1→2,4)-Xylp e (1→3,4)-Xylp e xilitol ((1→2,3,4)-Xylp) (1,7 a 6,1% molar, 4,8 a 9,5% molar e 3,0 a 5,0% molar, respectivamente). Para além destas ligações glicosídicas, estas fracções ainda apresentam resíduos de Glcp em ligação (1→4) e em ligação terminal, nunca com um grau superior de polimerização de 5. Estes resultados mostram que as fracções “ETSn” são constituídas por uma complexa mistura de oligossacarídeos



e dissacarídeos de Glc com arabinoxilo-oligossacarídeos com graus de polimerização e ramificação compreendidos entre 7 a 18 resíduos de Xyl e 0,17 a 0,30, respectivamente.

Os resultados da análise de metilação sugerem que as fracções “ET70”, em comparação com as fracções “ETSn” para a mesma temperatura, as arabinoxilanas são menos ramificadas e com maiores DP. Existe concordância nos resultados, porque ao adicionar etanol ao extracto obtido após o tratamento hidrotérmico assistido por MW os polímeros com maiores DP e menores graus de ramificação são os primeiros a precipitar o que pode ser comprovado nas **Tabelas 15 e 16**.

O tratamento hidrotérmico provoca alterações na estrutura AX por despolimerização e desramificação destes polissacarídeos, verificado pela diminuição da Ara em ligação terminal e da cadeia de xilana ((1→2,3)-Xylp,(1→3,4)-Xylp e xilitol).

O conteúdo de AX presentes nas fracções pode ser estimado contabilizando os resíduos de Xyl e os resíduos de Ara terminais. Pela **Figura 22** verifica-se que a extracção de AX aumenta com o aumento da temperatura. A extracção máxima ocorreu a 210 °C com um valor de 43%.

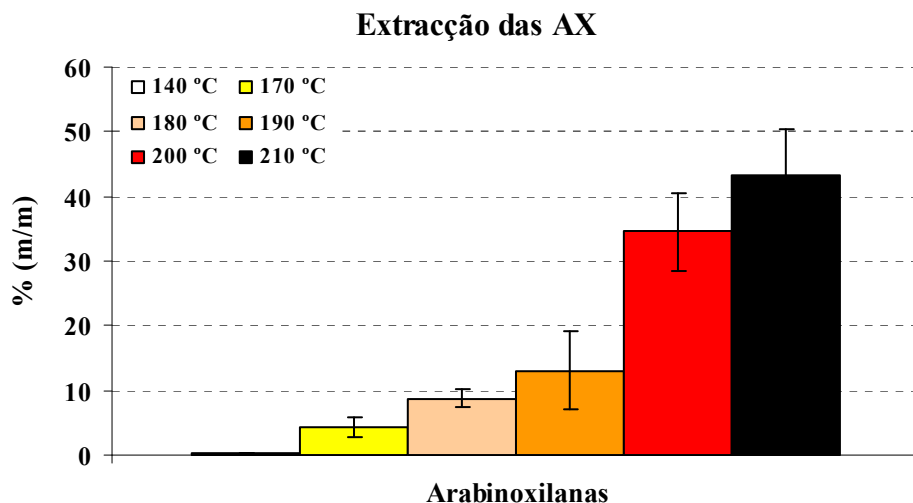


Figura 22: Representação gráfica da quantidade de AX extraída nos diferentes ensaios de temperaturas (140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C) utilizadas no tratamento hidrotérmico da dreche, utilizando a irradiação do MW. Os valores apresentados são médias de quadruplicados para cada ensaio de temperatura.



Tabela 15: Análise de metilação das fracções obtidas por precipitação em etanol a 70% (v/v) do extracto aquoso da dreche, após tratamento do MW nos diferentes ensaios de temperatura (140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C) que correspondem à fracção “ET70”. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada ensaio de temperatura.

Ligação Glicosídica	Fracções ET70					
	140	170	180	190	200	210
T-Araf	5,3	13,2	12,0	10,6	8,5	4,7
2-Araf	0,2	0,5	0,6	0,5	1,5	0,6
3-Araf	0,4	0,6	0,8	0,6	0,5	0,5
5-Araf	0,6	0,6	0,4	0,1	0,3	0,1
Total	6,5^a (9,1)^b	14,9 (21,4)	13,8 (21,4)	11,8 (21,7)	10,8 (17,2)	6,0 (13,6)
T-Xylp	0,6	1,4	1,9	2,0	1,4	3,5
4-Xylp	8,1	27,7	31,0	36,1	41,1	45,0
2,4-Xylp	1,0	4,1	4,9	4,9	4,4	2,9
3,4-Xylp	2,4	8,2	8,3	7,1	6,1	3,1
Xilitol	3,9	8,8	8,1	5,7	3,5	1,9
Total	16,0 (9,4)	50,2 (34,5)	54,1 (38,8)	55,9 (43,0)	56,5 (45,3)	56,4 (47,4)
4,6-Man	2,3	0,9	0,4	0,6	0,3	0,4
Total	2,3 (0,9)	0,9 (0,8)	0,4 (0,7)	0,6 (0,6)	0,3 (0,6)	0,4 (0,7)
T-Gal	0,7	0,3	0,5	0,3	0,2	1,7
6-Gal	0,1	0,2	—	—	—	—
Total	0,8 (2,4)	0,3 (3,2)	0,5 (3,5)	0,3 (3,3)	0,2 (3,4)	1,7 (3,2)
T-Glc	6,8	2,6	2,4	1,6	1,6	3,1
3-Glc	1,3	0,6	0,3	0,3	0,2	0,3
4-Glc	65,7	30,1	28,3	29,5	30,3	32,2
3,4-Glc	0,4	0,1	—	—	—	—
3,6-Glc	0,2	0,1	—	—	—	—
Glucitol	0,1	—	—	—	—	—
Total	74,4 (77,4)	33,5 (39,7)	31,0 (35,2)	31,5 (31,1)	32,1 (33,3)	35,6 (34,8)
Grau de Polimerização aparente (AX)	26	35	29	27	40	16
Grau de Ramificação aparente (AX)	0,21	0,24	0,24	0,21	0,19	0,11

^a – percentagem molar obtida por soma de todos os resíduos do mesmo glicido obtidos por análise de metilação; ^b – percentagem molar obtida pela análise dos açúcares neutros



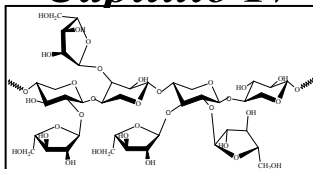
Tabela 16: Análise de metilação das frações obtidas no sobrenadante de etanol a 70% (v/v), após tratamento do MW nos diferentes ensaios de temperatura (140, 170, 180, 190, 200 e 210 °C) que correspondem à fração “ETSn”. Os valores apresentados são médias de duplicados para cada ensaio de temperatura.

Ligação Glicosídica	Fracções ETSn					
	140	170	180	190	200	210
T-Araf	0,9	4,9	8,1	8,2	7,2	5,2
2-Araf	—	0,2	0,6	0,8	1,5	1,9
3-Araf	0,1	0,8	2,1	1,8	2,1	1,7
5-Araf	0,8	3,3	4,7	2,1	1,4	0,9
Total	1,8^a (9,5) ^b	9,3 (32,3)	15,4 (41,4)	13,0 (41,6)	12,2 (37,9)	9,7 (30,4)
T-Xylp	0,4	1,2	3,0	3,5	5,4	6,8
4-Xylp	2,1	10,8	21,8	35,2	41,3	52,3
2,4-Xylp	—	1,7	4,2	5,7	6,1	4,9
3,4-Xylp	0,5	4,8	8,8	9,5	9,5	7,0
Xilitol	—	3,0	5,8	5,1	5,0	—
Total	3,1 (4,8)	21,4 (15,6)	43,6 (23,9)	59,1 (31,9)	67,3 (40,0)	71,1 (47,1)
T-Gal	0,1	0,3	0,8	0,6	1,3	1,3
6-Gal	0,4	—	—	—	—	—
Total	0,5 (1,3)	0,3 (3,0)	0,8 (3,7)	0,6 (3,8)	1,3 (3,9)	1,3 (3,8)
T-Glc	43,1	28,1	14,7	7,5	5,1	3,7
3-Glc	0,3	—	—	—	—	—
4-Glc	51,2	40,9	25,5	19,8	14,0	14,2
Total	94,6 (81,5)	69,0 (46,2)	40,2 (28,0)	27,3 (20,5)	19,1 (16,0)	17,9 (16,8)
Grau de Polimerização (AX)	7	18	14	17	12	10
Grau de Ramificação (AX)	0,17	0,30	0,30	0,26	0,23	0,17

^a – percentagem molar obtida por soma de todos os resíduos do mesmo glicido obtidos por análise de metilação;

^b – percentagem molar obtida pela análise dos açúcares neutros

Capítulo IV



Conclusão





4. Conclusão

A dreche é um material lenhocelulósico em que é constituída maioritariamente por água (76%). Os principais constituintes da matéria seca da dreche são os polissacarídeos (53%), as proteínas (30%) e os lípidos (8%). A matéria inorgânica da dreche corresponde a 4%. Os restantes 5% corresponde a lenhina e a compostos fenólicos, em que, de acordo com a bibliografia, o ácido ferúlico é o composto maioritário dentro da classe dos compostos fenólicos (Faulds *et al*, 2004).

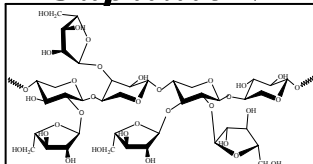
Um dos objectivos específicos desta dissertação consiste em definir a fracção fibrosa da dreche que é essencialmente constituída pelos polissacarídeos. A composição dos açúcares neutros da dreche permite inferir a presença de AX, glucanas não celulósicas e celulose. As AX da dreche são cerca de 27% dos polissacarídeos. De acordo com os resultados obtidos, numa tonelada de dreche podem existir em média cerca de 68 kg de AX. O desenvolvimento de um processo de isolamento destes polissacarídeos implica uma avaliação ao nível de rendimento de extracção e a viabilidade económica do mesmo, visando explorar a possibilidade de isolar as AX da dreche com diversas metodologias de extracção.

As AX da dreche foram extraídas com sucesso por extracção sequencial com soluções de KOH de concentração crescente e pelo tratamento hidrotérmico utilizando a irradiação por microondas. Através da composição de monossacarídeos e análise estrutural por metilação foi possível identificar as características das ligações glicosídicas das AX.

Neste trabalho foram estudadas, em detalhe, as características estruturais das AX das fracções extraídas com tratamento com KOH e com o tratamento hidrotérmico assistido por micro-ondas. Estas duas metodologias de extracção permitem obter AX com diferenças ao nível do grau de polimerização e das ramificações, sendo as extraídas por micro-ondas, dependendo das condições utilizadas, mais curtas e desramificadas.

Neste trabalho propôs-se uma metodologia capaz de extrair AX da dreche de uma forma quantitativa e rentável de forma a ser aplicada na indústria cervejeira, de forma o poderem ser valorizadas como aditivos alimentares com potenciais efeitos pré-bióticos e imuno-estimuladores.

Capítulo V



Perspectivas de Estudos Futuros





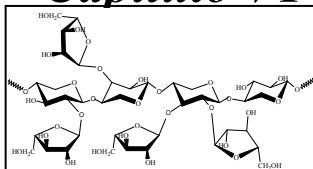
5. Perspectivas de Estudos Futuros

A dreche é uma fonte de AX pelo que seria interessante estudar processos para produzir AX com diferentes graus de polimerização e de ramificação, permitindo escolher quais se relacionam com o potencial efeito imunoestimulador e prebiótico atribuído a este tipo de polissacarídeos. Será também importante avaliar as características estruturais e de solubilidade das AX com vista a definir as potenciais aplicações e estudar modificações químicas das AX para aumentar a solubilidade destes polissacarídeos.

Por outro lado, o aproveitamento e valorização das AX da dreche, um material produzido em larga escala pelas indústrias cervejeiras que não é objecto de aproveitamento nem de valorização em termos de compostos bioactivos, terá impacto económico positivo.

Será também interessante investigar metodologias alternativas de pré-tratamento da dreche como a alta pressão ou os tratamentos por ultra-sons (Ebringerová & Hromádková, 2010) para aumentar os rendimentos de extracção e/ou permitir o uso de reagentes alcalinos mais suaves.

Capítulo VI



Referências Bibliográficas





6. Referências Bibliográficas

AACC. (2001). “The definition of dietary fibre.” *Cereal Foods World*, **46**, 112-126.

Abbas, A. K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. (2000). “Cellular and Molecular Immunology”, 4th Edition, Saunders.

Adams, E. L.; Kroon, P. A.; Williamson, G. & Morris, V. J.. (2003). “Characterisation of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy.” *Carbohydrate Research*, **338** (8), 771-780.

Adams, E. L.; Kroon, P. A.; Williamson, G. & Morris, V. J. (2005). “AFM studies of water-soluble wheat arabinoxylans - effects of esterase treatment.” *Carbohydrate Research*, **340** (11), 1841-1845.

Ainsworth, P.; İbanoğlu, S.; Plunkett, A.; İbanoğlu, E. & Stojceska, V. (2007). “Effect of brewers spent grain addition and screw speed on the selected physical and nutritional properties of an extruded snack.” *Journal of Food Engineering*, **81** (4), 702-709.

Antoine, C.; Peyron, S. ; Mabilhe, F. ; Lapierre, C. ; Bouchet, B. ; Abecassis, J. & Rouau, X. (2003). “Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (7), 2026-2033.

Antoine, C. ; Peyron, S. ; Lullien-Pellerin, V. ; Abecassis, J. & Rouau, X. (2005). “Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers.” *Journal of Cereal Science*, **39** (3), 387-393.

Anker-Nilssen, K.; Sahlstrøm, S.; Knutsen, S. H.; Holtekjøn, A. K. & Uhlen, A.K. (2008). “Influence of growth temperature on content, viscosity and relative molecular weight of water-soluble β -glucans in barley (*Hordeum vulgare* L.).” *Journal of Cereal Science*, **48** (3), 670-677.



Athanasios, M.; Georgios, L. & Michael, K. (2007). “A rapid microwave-assisted derivatization process for the determination of phenolic acids in brewer’s spent grains.” *Food Chemistry*, **102**, 606-611.

Bacic, A. & Stone, B.A. (1981a). “Isolation and ultrastructure of aleurone cell walls from wheat and barley.” *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**, 453–474.

Bacic, A. & Stone, B.A. (1981b) “Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley,” *Australian Journal of Plant Physiology*, **8**, 475–495.

Bae, S. M.; Park, Y. C.; Lee, T. H.; Kweon, D. H.; Choi, J. H.; Kim, S. K.; Ryu, Y. W. & Seo, J. H. (2004). “Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations.” *Enzyme and Microbial Technology*, **35** (6-7), 545-549.

Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (2006). Functional Food Carbohydrates. *Functional foods and nutraceuticals series*, CRC Press.

Blakeney, A. B.; Harris, P. J.; Henry, R.J. & Stone, B. A. (1983). “ A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis.” *Carbohydrate Research*, **113**, 291-299.

Blumenkrantz, N. & Asboe-Hansen, G. (1973). “New method for quantitative determination of uronic acids.” *Analytical Chemistry*, **54** (7), 484-489.

Bunzel, M.; Allerdings, E.; Ralph, J. & Steinhart, H. (2008). “Cross-linking of arabinoxylans via 8-8-coupled diferulates as demonstrated by isolation and identification of diarabinosyl 8-8 (cyclic)-dehydrodiferulate from maize bran.” *Journal of Cereal Science*, **47** (1), 29-40.



Campbell, G. L.; Rossnagel, B. G. & Bhatti, R. (1993). Evaluation of hull-less barley genotypes varying in extract viscosity in broiler chick diets. *Animal Feed Science and Technology*, **41**, 191-197.

Carvajal-Millan, Guilbert, S.; Morel, M. H. & Micard, V. (2005). "Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties." *Carbohydrate Polymers*, **60** (4), 431-438.

Carvalho, F.; Esteves, M. P.; Parajó, J.C.; Pereira, H.; Gírio, F.M. (2004). "Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain." *Bioresource Technology*, **91** (1), 93-100.

Celus, I.; Briggs, K. & Delcour, J.A. (2006). "The effects of malting on barley protein extractability." *Journal of Cereal Science*, **44** (2), 203-211.

Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984). "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrate." *Carbohydrate Research*, **131** (2), 209-217.

Coimbra; M.A.; Delgadillo, I.; Waldron, K. W. & Selvendran R. R (1996). "Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp." *Plant Cell Wall Analysis*, In Modern Methods of Plant Analysis, Edited by Linskens; H. -F. & Jackson In Springer- Verlag, Vol 17, 19- 44.

Coimbra, M.A.; Waldron, K.W. & Selvendran, R.R. (1995) "Isolation and Characterisation of Cell Wall Polymers from the Heavily Lignified Tissues of Olive (*Olea europaea*) Seed Hull", *Carbohydrate Polymers*, **27**, 285-294.

Cyran, M., Izydorczyk, M. S. & MacGregor, A. W (2002). "Structural characteristics of water-extractable nonstarch polysaccharides from barley malt." *Cereal Chemistry*, **79** (3), 359-366.



Courtin, C. M.; Broekaert, W. F.; Swennen, K.; Lescroart, O.; Onagbesan, O.; Buyse, J.; Decuypere, E.; Van de Wiele, T. V.; Marzorati, M.; Verstraete, W., Huyghebaert, G. & Delcour, J. A. (2008). “Dietary inclusion of wheat bran arabinoxyloligosaccharides induces beneficial nutritional effects in chickens.” *Cereal Chemistry*, **85** (5), 607-613.

Dervilly, G.; Leclercq, C.; Zimmermann, D.; Roue, C.; Thibault, J. F. & Saulnier, L.(2002). “Isolation and characterization of high molar mass water-soluble arabinoxylans from barley and barley malt.” *Carbohydrate Polymers*, **47** (2), 143-149.

DuBois, M.; Gilles, K.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Simth, F. (1956). “A colorimetric method for the determination sugars and related substances.” *Analytical Chemistry*, **28** (3), 350-356.

Ebringerová, A. & Hromádková, Z. (2010). “An overview on the application of ultrasound in extraction, separation and purification of plant polysaccharides.” *Central European Journal of Chemistry*, **8** (2), 243-257.

Eliasson, A. –C. (2006) “Carbohydrate in Food.” Second Edition, Taylors & Francis Group LLC.

Eskilsson, C. S. & Björklund, E. (2000). “Analytical-scale microwave-assisted extraction.” *Journal of Chromatography A*, **902**, 227-250.

Evers, T. & Millar, S. (2002). “Cereal Grain Structure and Development Some Implications for Quality.” *Journal of Cereal Science*, **36** (3), 261-284.

Faulds, C. B.; Mandalari, G.; LoCurto, R.; Bisignano, G. & Waldron, K. W. (2004). “Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer’s grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*.” *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64** (5), 644-650.



Fengel, D. & Wegener, G. 1984. "Cellulose". *Em: Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reactions*, W. de Gruyter, New York, USA, Capítulo. 4, 66-105.

Forssell, P.; Kontkanen, H.; Schols, H. A.; Hinz, S.; Eijssink, V. G. H.; Treimo, J.; Robertson, J. A.; Waldron, K. W.; Faulds, C. B. & Buchert, J. (2008). "Hydrolysis of Brewers' Spent Grain by Carbohydrate Degrading Enzymes". *Journal of the Institute of Brewing*, **114** (4), 306-314.

Ghoneum, M. & Gollapudi, S. (2003). "Modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/biobran) sensitizes human T cell leukemia cells to death receptor (CD95)-induced apoptosis." *Cancer Letters*, **201** (1), 41-49.

Ghotra, B. S. ; Vasanthan, T. & Temelli, F. (2008). "Structural characterization of barley beta-glucan extracted using a novel fractionation technique." *Food Research International*, **41** (10), 957-963.

Grabber, J. H.; Ralph, J. & Hatfield, D. (2000). "Cross-Linking of Maize Walls by Ferulate Dimerization and Incorporation into Lignin". *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **48**, 6106-6113.

Gröndahl, M.; Eriksson, L. & Gatenholm, P. (2004). "Material properties of plasticized hardwood Xylans for potential application as oxygen barrier films." *Biomacromolecules*, **5** (4), 1528-1535.

Guiga, W.; Boivin, P.; Ouarnier, N.; Fournier, F. & Fick, M. (2008). Quantification of the inhibitory effect of steep effluents on barley germination. *Process Biochemistry*, **43** (3), 311-319.

Gullón, P.; González-Munoz, M.J.; Van Gool, M. P.; Schols, H. A.; Hirsch, J.; Ebringerová, A. & Parajó J. C. (2010). "Production, Refining, Structural Characterization and Fermentability of Rice Husk Xylooligosaccharides." *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, **58**, 3632-3641.



- Han, J. Y. (2000). "Structural characteristics of arabinoxylan in barley, malt, and beer." *Food Chemistry*, **70** (2), 131-138.
- Harris, P. J., Blakeney, A. B.; Henry, R. J. & Stone, B. A. (1988). "Plants – Gas chromatography determination of the monosaccharide composition of plant cell wall preparations." *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, **71**, 272-275.
- Harris, P.J.; Henry, R.J.; Blakeney, A.B. & Stone, B.A. (1984). "An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides." *Carbohydrate Research*, **127** (1), 59-73.
- Havenaar, R. (1984). "The Anti-Cariogenic Potential Of Xylitol In Comparison With Sodium-Fluoride In Rat Caries Experiments." *Journal of Dental Research*, **63** (2), 120-123.
- Hernández, A.M.; Rodríguez, J. L.; López, B. & Zerquera, O.L. (1999). "Chemical and functional characterisation of mal spent grain." *Alimentaria*, **105**, 105-107.
- Hoebler; C.; David, A.; Delort-Laval, J. (1989). Rapid acid hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and simplified quantitative determination of their neutral monosaccharides by gas-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **37**, 360-367.
- Höije, A.; Gröndahl, M.; Tømmeraas, K. & Gatenholm, P. (2005). "Isolation and characterization of physicochemical and material properties of arabinoxylans from barley husks." *Carbohydrate Polymers*, **61** (3), 266-275.
- Höije, A.; Sandström, C.; Roubroeks, J. P.; Andersson, R.; Gohil, S. & Gatenholm, P. (2006). "Evidence of the presence of 2-O-β-D-xylopyranosyl-α-L-arabinofuranose side chains in barley husk arabinoxylan." *Carbohydrate Research*, **341** (18), 2959-2966.



Höije, A.; Sternemalm, E.; Heikkinen, S.; Tenkanen, M. & Gatenholm, P. (2008). "Material properties of films from enzymatically tailored arabinoxylans." *Biomacromolecules*, **9** (7), 2042-2047.

Hollmann, J. & Lindhauer, M. G. (2005). "Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran." *Carbohydrate Polymers*, **59** (2), 225-230.

Hughes, S. A., Shewry, P. R.; Li, L.; Gibson, G. R.; Sanz, M. L. & Rastall, R. A. (2007). "In vitro fermentation by human fecal microflora of wheat arabinoxylans." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (11), 4589-4595.

Izydorczyk, M. S. & Biliaderis, C.G. (1995). "Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties." *Carbohydrate Polymers*, **28** (1), 33-48.

Izydorczyk, M. S., Macri, L. J. & MacGregor, A. W. (1998a). "Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides - I. Water-extractable beta-glucans and arabinoxylans." *Carbohydrate Polymers*, **35** (3-4), 249-258.

Izydorczyk, M. S., Macri, L. J. & MacGregor, A. W. (1998b). "Structure and physicochemical properties of barley non-starch polysaccharides - II. Alkali-extractable beta-glucans and arabinoxylans." *Carbohydrate Polymers*, **35** (3-4), 259-269.

Jadhav, S. J.; Lutz, S. E.; Ghorpade, V. M. & Salunkhe, D. H. (1998) "Barley: Chemistry and Value-Added Processing." *Critical Reviews in Food Science*, **38** (2), 123-171.

Jay, A. J.; Parker, M. L.; Faulks, R.; Husband, F.; Wilde, P.; Smith, A. C.; Faulds, C. B. & Waldron K. W (2008). "A systematic micro-dissection of brewers' spent grain." *Journal of Cereal Science*, **47** (2), 357-364.

Jiang, Z. Q.; Deng, W.; Zhu, Y. P.; Li, L. T. ; Sheng, Y. J. & Hayashi, K. (2004) "The recombinant xylanase B of *Thermotoga maritima* is highly xylan specific and produces



exclusively xylobiose from xylans, a unique character for industrial applications.” *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **27** (4-6), 207-213.

Johansson, L. ; Virkki, L. ; Anttila, H.; Esselstrom, H.;Tuomainen, P. & Sontag-Strohm, T.. (2006). Hydrolysis of beta-glucan. *Food Chemistry*, **97** (1), 71-79.

Kabel, M. A.; Carneiro, F.; Garrote, G.; Avgerinos, E.; Koukios, E.; Parajo, J. C.; Girio, F. M.; Schols, H. A. & Voragen, A. G. J. (2002). “Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides.” *Carbohydrate Polymers*, **50** (1), 47-56.

Kanauchi, O & Agata, K. (1997). “Protein, and dietary fiber-rich new foodstuff from brewers’ spent grain increase excretion of feces and jejum mucosal protein content in rats.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **62**, 29-33.

Kanauchi, O; Mitsuyama, K. & Araki, Y. (2001). “Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis.” *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **59** (2), 59–62.

Kent, N.L. (1983). Barley, in *Technology of Cereal*, 3 rd ed., Pergamon Press , Oxford , U.K., 154

Krawczyk, H.; Persson, T.; Andersson, A. & Jönsson, A. S. (2008). “Isolation of hemicelluloses from barley husks.” *Food and Bioproducts Processing*, **86** (C1), 31-36.

Lazaridou, A. & C. G. Biliaderis (2007). “Molecular aspects of cereal beta-glucan functionality: Physical properties, technological applications and physiological effects.” *Journal of Cereal Science*, **46** (2), 101-118.

Lazaridou, A.; Chornick, T., Biliaderis, C. G. & Izydorczyk, M. S. (2008). “Composition and molecular structure of polysaccharides released from barley endosperm cell walls by



sequential extraction with water, malt enzymes, and alkali.” *Journal of Cereal Science*, **48** (2), 304-318.

Lee, R. C.; Burton, R. A.; Hrmova, M. & Fincher, G. B. (2001). “Barley arabinoxylan arabinofuranohydrolases: purification, characterization and determination of primary structures from cDNA clones.” *Biochemical Journal*, **356**, 181-189.

Lewis, M & Young T.W. (1995). “Brewing” 1 First Edition, Chapman & Hall Capítulos 3, 4, 5, 6 e 7, 36-119.

Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. & Cummings, J. H. (2006). “Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract.” *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **24** (5), 701-714.

MacGregor A.W. & Fincher, G.B. (1993) “Carbohydrates of the barley grain. In: A.W. MacGregor and R.S. Bhatti, Editors, *Barley: Chemistry and Technology*, Am. Ass. Cereal Chemists Inc., St Paul, Minnesota.

MacKenzie, S. L. & Tenaschuk, D. (1974).” Gas-liquid chromatography of N-heptafluorobutyryl isobutyl esters of amino acids.” *Journal of Chromatography A*, **97**, 19-24.

MacKenzie, S. L. (1987). “Gas chromatography analysis of amino acids as N-heptafluorobutyryl isobutyl esters.” *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, **70** (1), 151-160.

Madhukumar, M. S.& Muralikrishna, G. (2010). “Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk (*Cicer arietinum* L.) and wheat bran (*Triticum aestivum*).” *Food Chemistry*, **118** (2), 215-223.



Mandalari, G.; Faulds, C. B.; Sancho, A. I.; Saija, A.; Bisignano, G.; LoCurto, R.; Waldron, K. W. (2005) "Fractionation and characterization of arabinoxylans from brewers' spent grain and wheat bran." *Journal of Cereal Science*, **42** (2), 205-212.

Miller, J. N. & Miller J. C. (2000). "Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry." 4th Edition, Pearson Education.

Mosier, N.; Charles Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R. ; Lee, Y. Y. ; Holtzapple, M. & Ladisch, M. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, **96** (6), 673-686.

Muralikrishna, G. & Rao, M. (2007). Cereal non-cellulosic polysaccharides: Structure and function relationship - An overview." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47** (6), 599-610.

Mussatto, S. I. & Roberto, I. C. (2005). "Acid hydrolysis and fermentation of brewers' spent grain to produce xylitol." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85** (14), 2453-2460.

Mussatto, S. I.; Dragone, G. & Roberto, I. C. (2006). "Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications." *Journal of Cereal Science*, **43** (1), 205-212.

Mussatto, S. I.; Fernandes, M. & Roberto, I. C. (2007). "Lignin recovery from brewer's spent grain black liquor." *Carbohydrate Polymers*, **70**, 218-223.

Nunes, F. M. & Coimbra M. A.(2002). "Chemical Characterization of Galactomannans and Arabinogalactanas from Two Arabica Coffee Infusions As Affected by the Degree of Roast." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 1429-1434.

Ogawa, K.; Takeuchi, M. & Nakamura, N. (2005). "Immunological effects of partially hydrolyzed arabinoxylan from corn husk in mice." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69** (1), 19-25.



Oscarsson, M.; Andersson, R.; Salomonsson, A. C. & Åman, P. (1996). "Chemical composition of barley samples focusing on dietary fibre components." *Journal of Cereal Science*, **24** (2), 161-170.

Öztürk, S.; Özboy, Ö.; Cavidoğlu, İ. & Köksel, H. (2002). "Effects of Brewer's Spent Grain on the Quality and Dietary Fiber Content of Cookies." *Journal of the Institute of Brewing*, **108** (1), 23-27.

Pandima Devi; K. ; Ram; M. S.; Sreepriya, M.; Ilavazhagan, G & Devaki, T. (2003). "Immunomodulatory effects of *Premna tomentosa* extract against Cr (VI) induced toxicity in splenic lymphocytes—an in vitro study". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **57**, 105-108.

Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdahl, B.; Galbe, M.; Larsson, M.; Stenberg, K.; Szengyel, Z.; Tengborg, C. & Zacchi, G. (1996) "Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics" *Bioresource Technology*, **58**, 171–179.

Parker, M. L.; Ng, A. & Waldron, K. W. "The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **85** (15), 2539-2547.

Pastell, H.; Virkki, L.; Harju, E.; Tuomainen, P. & Tenkanen, M. (2009a). "Presence of 1 - > 3-linked 2-O-beta-D-xylopyranosyl-alpha-L-arabinofuranosyl side chains in cereal arabinoxylans." *Carbohydrate Research*, **344** (18), 2480-2488.

Pastell, H.; Westermann, P; Meyer, A. S.; Tuomainen, P. & Tenkanen, M. (2009b). "In Vitro Fermentation of Arabinoxylan-Derived Carbohydrates by Bifidobacteria and Mixed Fecal Microbiota." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57** (18), 8598-8606.

Pepper, T. and P. M. Olinger (1988). "Xylitol In Sugar-Free Confections." *Food Technology*, **42** (10), 98-106.



- Pitkanen, L. ; Tuomainen, P. ; Virkki, L. ; Aseyev, V. & Tenkanen, M. (2008). “Structural comparison of arabinoxylans from two barley side-stream fractions.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56** (13), 5069-5077.
- Prentice, N. & Resfguard, J. M (1978). “ Enzymatic hydrolysis of brewers’ spent grain.” *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **36**, 196-200.
- Rao, M. V. S. S. T. S. & Muralikrishna, G. (2004). “Structural analysis of arabinoxylans isolated from native and mated finger millet (*Eleusine coracana*, ragi).” *Carbohydrate Research*, **339**, 2457-2463.
- Revanappa, S. B.; Nandini, C. D. & Salimath, P. V. (2010). “Structural characaterisation of pentosans from hemicellulose B of wheat varieties with varying chapatti-making quality.” *Food Chemistry*, **119**, 27-33.
- Rhodes, D. I.; Sadek, M. & Stone, B. A. (2002). “Hydroxycinnamic acids in walls of wheat aleurone cells.” *Journal of Cereal Science*, **36** (1): 67-81.
- Robertson, J. A.; I’Anson, K. J. A.; Treimo, J.; Faulds, C. B.; Brocklehurst, T. F.; Eijssink, V. G. H. & Waldron , K.W. (2010). “Profiling brewers’ spent grain for composition and microbial ecology at the site of production.” *LWT – Food Science and Technology*, **43**, 890-896.
- Roos, A. A.; Persson, T. ; Krawczyk, H. ; Zacchi, G. & Stålbrand H. (2009). “Extraction of water-soluble hemicelluloses from barley husks.” *Bioresource Technology*, **100** (2), 763-769.
- Rose, D. J. & Inglett, G. E. (2010). “Production of feruloyted arabinoxyloligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis.” *Food Chemistry*, **119**, 1613-1618.



Saha, B. C. & Bothast, R. J. (1997). "Microbial production of xylitol." *Fuels and Chemicals from Biomass*. B. C. Saha and J. Woodward. Washington, American Chemical Society, 666, 307-319.

Saha, B. C. (2003). "Hemicellulose bioconversion." *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**, 279-281.

Santos, M.; Jiménez, J. J.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. & Nozal, M. J. del. (2003). "Variability of brewer's spent grain within a brewery." *Food Chemistry*, **80** (1), 17-21.

Saulnier, L.; Sado, P. E.; Branlard, G.; Charmet, G. & Guillon, F. (2007). "Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties." *Journal of Cereal Science*, **46** (3), 261-281.

Saulnier, D. M.; Spinler, J. K.; Gibson, G. R. & Versalovic, J. (2009). "Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods." *Current Opinion in Biotechnology*, **20** (2), 135-141.

Scheppach, W.; Bartram, H. P. & Richter, F. (1995). "Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, **31**, 1077-1080.

Schooneveld-Bergmans, M. E. F.; van Dijk, V. M.; Beldman, G. & Voragen, A. G. J. (1999). "Physicochemical characteristics of wheat bran glucuronoarabinoxylans." *Journal of Cereal Science*, **29** (1), 49-61.

Selvendran, R. R.; March, J. F. & Ring, S. G. (1979). "Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber." *Analytical Biochemistry*, **96**, 282-292.

Silva, F.; Nogueira, L. C.; Gonçalves, C.; Ferreira, A. A.; Ferreira, I. M P. L. V. O. & Teixeira, N. (2008). "Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties." *Analytical, Nutritional and Clinical Methods*, **106**, 820-829.



Söderqvist Lindblad, M., Ranucci, E. & Albertsson, A.-C. (2001). "Biodegradable polymers from renewable sources. New hemicellulose-based hydrogels." *Macromolecular Rapid Communication*, **22**, 962–967.

Stojceska, V. & Ainsworth P. (2008a). "The effect of different enzymes on the quality of high-fibre enriched brewer's spent grain breads". *Food Chemistry*, **110** (4), 865-872.

Stojceska, V.; Ainsworth, P.; Plunkett, A. & İbanoğlu, S. (2008b). "The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks using extrusion technology." *Journal of Cereal Science*, **47** (3), 469-479.

Storsley, J. M.; Izydorczyk, M. S.; You, S.; Biliaderis, C. G. & Rossnagel, B.(2003) "Structure and physicochemical properties of β -glucans and arabinoxylans isolated from hull-less barley." *Food Hydrocolloids*, **17** (6), 831-844.

Sjöström, E. 1981. Wood Polysaccharides. *Em: Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*. Academic Press Inc., New York, USA, Capítulo. 3, 49-67.

Sun, R. C. & X. F. Sun (2002). "Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw." *Carbohydrate Polymers*, **49** (4), 415-423.

Tang, Z. W.; Cenkowski, S. & Izydorczyk, M. (2005). "Thin-layer drying of spent grains in superheated steam." *Journal of Food Engineering*, **67** (4), 457-465.

Valverde, P. (1994). "Barley spent grain and its future." *Cerveza y Malta*, **122**, 7-26.

Vinkx, C. J. A. & Delcour, J. A. (1996). "Rye (*Secale cereale* L) arabinoxylans: A critical review." *Journal of Cereal Science*, **24** (1), 1-14.



Wilson, S. M.; Burton, R. A.; Doblin, M. S.; Stone, B.A; Newbigin, E. J.; Fincher G. J. & Bacic, A. (2006). “Temporal and spatial appearance of wall polysaccharides during cellularization of barley (*Hordeum vulgare*) endosperm.” *Planta*, **224**, 655–667.

Wollowski, I.; Rechelemmer G. & Pool-Zobel, B.L. (2001). “Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer.” *American Journal of Clinical Nutrition*, **73** (2), 451S-455S.

Wroslstad, R. E.; Acree, T. E.; Decker, E. A.; Penner, M. H.; Reid, D. S.; Schawartz, S. J. ; Shoemaker, C. f.; Smith, D.; & Sporns, P. (2005). “Handbook of Food Analytical Chemistry – Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates.” Vol 1, Wiley – Interscience.

Yeh, C. T. & Yen, G. C. (2003). “Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51** (5), 1474-1479.

Zumwalt, R. W.; Absheer, J. S.; Kaiser, F. E. & Gehrke, C. W. (1987). “Acid hydrolysis of proteins for chromatographic analysis of amino acids.” *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*, **70** (1), 147-151.